

37  
2eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**



**PERFIL ELECTROFORETICO DE ALGUNAS  
HEMOGLOBINOPATIAS EN PERSONAS DE LA  
CIUDAD DE MEXICO Y AREA METROPOLITANA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
**VICTOR HUGO MEJIA MANCILLA**

ASESOR: Q. F. B. MA. ESTHER REVUELTA MIRANDA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'NI: Ing. Rafael Rodríguez Caballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: "Perfil electroforético de algunas hemoglobiopatías en personas de la ciudad de México y área metropolitana"

que presenta el pasante Victor Hugo Mejía Mancilla  
con número de cuenta: 8154599-1 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E ,  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Octubre de 1993

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ramón Gendijas Ramírez</u>
VOCAL	<u>I.B.Q. Francisco Montiel Sosa</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. María Esther Revuelta Miranda</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Antonio Sánchez Ortega</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha Patricia Zufiga Cruz</u>

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO A TODAS AQUELLAS  
PERSONAS QUE HAN CONTRIBUIDO EN MI FORMACION,  
DANDOME SU EJEMPLO O SU APOYO INCONDICIONAL.

SINCERAMENTE:

V. H. M. M.

Estimada Maria Esther :

# I N D I C E

RESUMEN	1
I.- GENERALIDADES	2
II.- HEMOGLOBINOPATIAS, TALASEMIAS Y OTRAS PATOLOGIAS GENETICAS DE HEMATIE.	11
II. 1.- HEMOGLOBINOPATIAS	11
II. 2.- TALASEMIAS	21
II. 3.- HEMOGLOBINAS ANORMALES EN MEXICO	25
III.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO PARA LAS HEMOGLOBINAS NORMALES Y ANORMALES	31
III. 1.- METODO ELECTROFORETICO	35
III. 2.- ELECTROFESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA	39
III. 3.- ELECTROFESIS DE HEMOGLOBINA	42
III. 4.- DIAGNOSTICO PRENATAL DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS	44
IV.- OBJETIVOS	47
IV. 1.- OBJETIVO GENERAL	47
IV. 2.- OBJETIVOS PARTICULARES	47
V.- MATERIALES Y METODOS	48
V. 1.- MATERIAL BIOLOGICO	48
V. 2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
V. 3.- EQUIPO	54
V. 4.- PROCEDIMIENTO	55
VI.- OBSERVACIONES Y RESULTADOS	65
VII.- DISCUSION	78
VIII.-CONCLUSIONES	79
IX.-BIBLIOGRAFIA.	81

## " RESUMEN "

El presente trabajo de investigación teórico-práctico tuvo como finalidad realizar un estudio en una población sana dirigido a detectar algún (os) caso (s) de Hemoglobina (s) patológica (s) ya que éstas son causantes de algunas malformaciones eritrocitarias y otras complicaciones.

Para tal fin se realizó primeramente una investigación bibliográfica de los casos y aspectos mas representativos del tema, desde sus inicios hasta sus últimos hallazgos. Asimismo se investigó acerca de los diversos métodos experimentales de que se disponen en el laboratorio para detectar éste tipo de anormalidades como son: Cromatografía, Curvas de Solubilidad, Inmunolectroforesis, Espectrofotometría, Microscopía Electrónica y otras pero especialmente acerca del método electroforético del cual nos ayudamos en ésta ocasión.

Para poder realizar éste estudio en la población seleccionada se tomó una muestra aleatoria de sus integrantes a quienes se les aplicó una encuesta individual para indagar acerca de sus hábitos y antecedentes familiares mas importantes. asimismo les fué tomada una muestra de sangre la cual fué analizada electroforéticamente así como en otros dos aspectos importantes.

Los resultados de los análisis efectuados a la muestra de la población fueron resumidos y tratados así como evaluados y discutidos para finalmente concluir acerca de los mismos, así como de la importancia de realizar éste tipo de estudios en poblaciones en las cuales no es de esperarse una alta incidencia de hemoglobinas anormales.

## I.- GENERALIDADES

De los compuestos orgánicos, uno de los más estudiados a profundidad por su importancia desde el punto de vista bioquímico genético, evolutivo y filogenético es la Hemoglobina.

La Hemoglobina es un compuesto de carácter protéico de forma tetramérica y cuyo peso molecular equivale a 64'450 Daltons. (1).

Está formada por un grupo Hem y una parte protéica Globina, el primero constituye tan solo el 4% del peso total de la molécula (dentro de éste porcentaje están incluidos un 0.4% de Hierro y un 3.6% de protoporfirina III), el 96% restante corresponde a la globina que tiene cuatro cadenas polipeptídicas: Dos "alfa" con 141 aminoácidos y dos "beta" con 146 aminoácidos cada una (1).

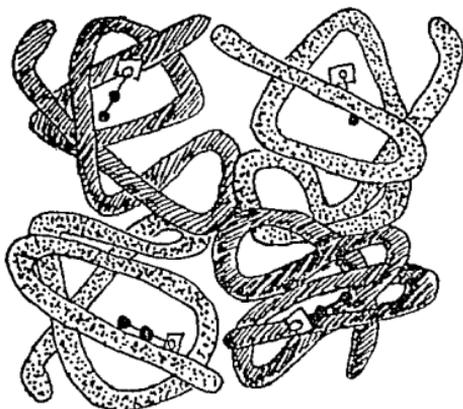
La estructura básica de la molécula de Hemoglobina y la interrelación de los componentes protéicos con grupos Hem se reveló por los estudios de Petrucci y colaboradores por difracción de rayos X en mioglobina de Caballo y más tarde en la hemoglobina humana (1).

La molécula en subunidades de globina cada una de ellas ligada a un grupo Hem presenta cuatro estructuras: (1).

- 1.- ESTRUCTURA PRIMARIA: Es la simple secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.
- 2.- ESTRUCTURA SECUNDARIA: Formada por cientos de aminoácidos que sufren un arreglo en el espacio de la alfa-hélice y por uniones de Hidrógeno que se establecen dentro de la misma molécula.
- 3.- ESTRUCTURA TERCIARIA: Los aminoácidos se disponen en el espacio en forma lineal (helicoidal) o en curvas, dejando expuestos en la superficie a los grupos polares y en la parte interna a los no polares.
- 4.-ESTRUCTURA CUATERNARIA : Es la configuración en el espacio de la molécula entera, su forma global y su distribución tetramérica como lo muestra la figura No. 1.

FIGURA NUMERO 1

ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA HEMOGLOBINA (38)



○ ATOMO CENTRAL DE FIERRO

□ PLACA HEME

●● MOLECULA DE OXIGENO

▨ CADENAS ALFA (141 a. a.)

▩ CADENAS BETA (146 a. a.)

Las cadenas polipeptídicas se componen de porciones alternadas helicoidales, la porción helicoidal se designa por las letras "A" a la "H" empezando por el "N" terminal y las porciones no helicoidales se designan por las letras de las dos hélices helicoidales adyacentes (1).

Las cadenas polipeptídicas alfa, beta, gama y delta difieren entre sí por la naturaleza, número y tamaño de los aminoácidos. Las cadenas alfa tienen 141 aminoácidos, las beta 146 al igual que las gama pero difieren en 36 aminoácidos respecto a las beta, también las delta tienen 146 y difieren de las beta en tan solo 10 aminoácidos (1).

El grupo Hem que se encuentra en cada átomo de globina consta de un sistema porfirínico con un átomo de fierro en forma ferrosa fijado en el centro a través de la unión de cuatro anillos pirrólicos (1).

La función de la hemoglobina está íntimamente relacionada con la disposición de las cadenas polipeptídicas y por las interrelaciones entre éstas, formando uniones de dos tipos:

- a).- Alfa<sub>2</sub> Beta<sub>1</sub> y Alfa<sub>2</sub>.- Llamado el contacto dimérico, formado por 34 residuos de aminoácidos con uniones de tipo hidrofóbico.
- b).- Alfa<sub>1</sub> Beta<sub>2</sub> y Alfa<sub>2</sub>.- Enlazados por 19 residuos de aminoácidos, éste contacto permite a la cadena tener un movimiento de deslizamiento durante el proceso de oxigenación.

Se ha visto que el tetrámero de hemoglobina se puede encontrar en el estado de oxihemoglobina o como desoxihemoglobina, estas dos conformaciones se encuentran en equilibrio y difieren en su afinidad por el oxígeno (1).

Los contactos Alfa<sub>1</sub> Beta<sub>2</sub> y Alfa<sub>2</sub> Beta<sub>1</sub> son los responsables de la interacción he-hem (oxigenándose un grupo hem se facilita la oxigenación de los otros) y en gran parte del efecto Bohr (Captación de H<sup>+</sup> para ayudar a la estabilización de la conformación desoxi de la hemoglobina), además cuando las cuatro cadenas polipeptídicas se ensamblan para formar un tetrámero, no lo hacen justamente y se forma una cavidad en el centro de la molécula, permitiendo que en éste sitio se acomode el 2, 3-difosfogliceraldehído ayudando a estabilizar la conformación desoxi de la hemoglobina (1).

Cada molécula de hemoglobina humana está formada por cuatro cadenas polipeptídicas. en la hemoglobina, A, dos cadenas son alfa y el segundo par son beta. En la hemoglobina A<sub>2</sub> el primer par es alfa y el segundo es delta, para la hemoglobina fetal dos son alfa y el segundo par son gamma (1).

La síntesis de una cadena polipeptídica está bajo control genético y es posible que cada tipo de proteínas sea determinado por su correspondiente gen estructural. La información para que el producto sea sintetizado es llevada del gen estructural a los ribosomas por el RNA mensajero, de aquí que la síntesis de cadenas polipeptídicas ocurra a nivel de ribosomas (1).

El control de la síntesis de cadenas polipeptídicas para la hemoglobina involucra algunas situaciones especiales. La primera es que cada gen estructural opera de modo independiente, al final la molécula se compone de dos pares de cadenas formando el tetrámero.

La segunda es que en el eritrocito normal del adulto hay tres tipos diferentes de hemoglobina que difieren en su concentración. También es característico en la síntesis de hemoglobina el cambio en la proporción de hemoglobina A<sub>1</sub> y Fetal, finalmente la proporción en síntesis de un tipo de cadena está como en los síndromes talasémicos afectada por la presencia de un gen que actúa como un posible represor sobre la síntesis de algún tipo de cadena (1).

En el individuo normal los dímeros de cadenas alfa, beta y gamma se forman en proporciones diferentes y se combinan, dos de un tipo ( $\alpha$ ) con dos del otro ( $\beta$ ) para formar las hemoglobinas normales, según lo podemos apreciar en la tabla No. 1.

## T A B L A   N U M E R O   1

### TIPOS DE HEMOGLOBINAS NORMALES, CADENAS DE QUE ESTAN FORMADAS Y ALGUNAS DE SUS CARACTERISTICAS ( 39 ).

<u>HEMOGLOBINA</u>	<u>CADENAS</u>	<u>CARACTERISTICAS</u>
A <sub>1</sub>	Alfa <sub>2</sub> - Beta <sub>2</sub>	Hemoglobina del adulto normal que constituye del 97 al 98% del total de la hemoglobina.
A <sub>2</sub>	Alfa <sub>2</sub> - Delta <sub>2</sub>	Del 0.5 al 3.5% de la hemoglobina total en el adulto.
F	Alfa <sub>2</sub> - Gamma <sub>2</sub>	También llamada hemoglobina fetal, es predominante en el nacimiento y se reemplaza casi totalmente por la hemoglobina A <sub>1</sub> durante los primeros meses posteriores al nacimiento. En el adulto oscila entre 0.2 y 2% .
Gowers 1	Epsilon <sub>4</sub>	Hemoglobina embrionaria, se encuentra hasta en 1% en embriones de 6.3 cm. de largo, desaparece después del segundo mes de gestación
Gowers 2	Alfa <sub>2</sub> Epsilon <sub>2</sub>	Se encuentra en menor proporción que la Gowers 1, en embriones de 6.3 cms. de largo está presente hasta en 0.5%.

Es interesante notar que durante la etapa embrionaria en los primeros dos meses se han detectado las hemoglobinas Gowers 1 y Gowers 2. La síntesis de las cadenas épsilon cesa al final del tercer mes de desarrollo embrionario, siendo reemplazadas por la hemoglobina empieza en el feto y se completa en el quinto o sexto mes después del nacimiento. La síntesis de cadenas alfa permanece constante, pero cerca del sexto mes de vida fetal las cadenas gamma comienzan a descender mientras que la síntesis de cadenas beta empieza a ascender (39).

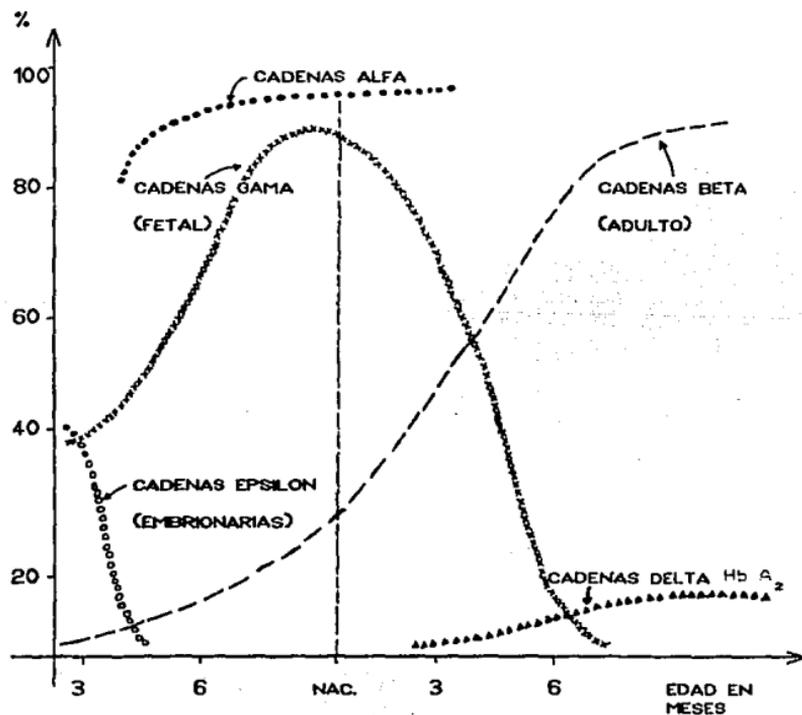
A los seis meses del nacimiento permanece una pequeña cantidad de hemoglobina fetal, persistiendo en la edad adulta una mínima porción (menos del 1.7%). Al mismo tiempo la síntesis de las cadenas beta se encuentra en pleno punto óptimo para formar así la hemoglobina A<sub>1</sub> que es la que se encuentra en mayor cantidad en los adultos (39).

Lo anterior podrá comprenderse mejor con la gráfica No. 1.

Con relación a la hemoglobina existen diferentes patologías o síndromes característicos, dentro de los cuales podemos señalar de gran trascendencia a las hemoglobinopatías y talasemias. Así también existen una gran variedad de trastornos con relación al eritrocito que implican su lisis, deficiencias enzimáticas, etcétera, que conllevan a cuadros clínicos de anemia.

GRAFICA NUMERO 1

NIVELES PORCENTUALES DE LAS DIVERSAS CADENAS HEMOGLOBINICAS DURANTE LAS ETAPAS GESTACIONAL, AL NACIMIENTO Y POSTNATAL ( 39 ).



## II.- HEMOGLOBINOPATIAS, TALASEMIAS Y OTRAS PATOLOGIAS GENETICAS HEMATIE.

### II.1.- HEMOGLOBINOPATIAS:

Se definen como hemoglobinopatías todos aquellos síntomas clínicos en los que existe como base una alteración estructural o funcional de la molécula de la hemoglobina (2).

La historia del descubrimiento de las hemoglobinas anormales se remonta al año de 1910 cuando J. B. Herrick, médico de Chicago, observó la presencia de glóbulos rojos en forma de Hoz (falciformes) en la sangre de algunos negros anémicos. De ahí surgieron las observaciones del fenómeno de Falciformación, demostrando tanto Enmel como Hahn y Gillespie por métodos diferentes, que la baja tensión de oxígeno induce la transformación de glóbulos rojos en células con forma de Hoz (2).

Para 1923 ya se sabía que éste fenómeno aparecía como un rasgo autosómico dominante y mas tarde se demostró que la dotación heterocigota de los genes daba por resultado el rasgo y que una dotación homocigota producía la enfermedad (2).

En la década de los treintas se distingue la drepanocitosis (anemia falciforme) de otra enfermedad de la Hemoglobina, la Talasemia, término introducido por Whipple y Bradford, caracterizada por la extrema poiquilocitosis y eliptocitosis en la sangre periférica de pacientes, proponiendo Caminopetros que dicho padecimiento es inherente a un gen Mendeliano recesivo (2).

Las investigaciones de ambas enfermedades continuaron sin interrumpirse hasta profundizarse cuando Pauling e Itano, en 1949, separan electroforéticamente dos hemoglobinas: La "S" (HbS), anormal de pacientes con falciformación y la A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) que se eleva en talasemia menor, padecimiento muy frecuente en niños anémicos Italianos (2).

A partir de los estudios electroforéticos de Hemoglobina "S" realizados por Pauling, Harvey e Itano, se avanza rápidamente en el conocimiento de la secuencia de aminoácidos descubriéndose la alteración molecular de otras hemoglobinas anormales como se verá mas adelante, conociéndose hasta la fecha más de doscientas, cada una con cambios específicos en sus cadenas bien sea por sustitución, adición o deleción de uno o más aminoácidos o bien por otras situaciones (3).

La sustitución de algunos aminoácidos en algunas de las cadenas de la molécula da a menudo como resultado alteraciones drásticas en su estructura y función, provocando una inestabilidad o alteración de su afinidad por el oxígeno: aún en heterocigotos en los cuales la mutante puede comprender a una pequeña porción del total de la molécula. Generalmente en éstos casos se producen efectos en su función y estabilidad por lo que se presentan anomalías clínicas (3).

Las alteraciones de la estructura primaria de la molécula de hemoglobina pueden afectar cualesquiera de las cadenas polipeptídicas, en consecuencia la función de una hemoglobina anormal depende no solo del tipo de la cadena afectada, sino también de la parte de la cadena en que ésta alteración se ha producido, y lo más importante, la sustitución de un aminoácido hidrofóbico por un aminoácido polar (caso de mutación más frecuente) modifica enteramente la estabilidad, cohesión y solubilidad de la molécula. En términos generales las hemoglobinopatías son el resultado de las mutaciones del ADN. (41).

La repercusión clínica de las hemoglobinopatías es muy variada: Algunas veces no existen síntomas clínicos tanto en portadores homocigotos como heterocigotos, en otros casos aparecen signos de anemia hemolítica solo en pacientes homocigotos, mientras que en los heterocigotos están libres de síntomas (Hemoglobinas S, C, D, y E), y hasta hay ocasiones en las que solo los portadores heterocigotos presentan hemólisis acentuada (Hemoglobina Köln) (42).

Estas diferencias dependen si la localización del trastorno en la molécula de hemoglobina modifica o no la estabilidad de la misma.

En general hay una sustitución de un aminoácido por otro en una de las cadenas peptídicas de la globina; las cadenas más frecuentemente afectadas son la alfa y la beta y en más raras ocasiones las gama o las delta. Ultimamente se han observado la ausencia de uno o más aminoácidos así como el alargamiento de las cadenas peptídicas, existen además hemoglobinopatías consistentes en la formación de un solo tipo de cadenas (por ejemplo, tenemos la hemoglobina H con cuatro cadenas beta o la hemoglobina de Bart con cuatro cadenas gama) (42).

Las hemoglobinas anormales pueden clasificarse en cinco grandes grupos generales:

1.-HEMOGLOBINAS ANORMALES POR SUSTITUCION, PERDIDA O ADICION DE UNO O MAS AMINOACIDOS:

A).- POR DELECCION O SUSTITUCION DE AMINOACIDOS EN LAS CADENAS ALFA : (6).

J-TORONTO

I

G-AUDHALI

TORINO

J-CERDEÑA

MEXICO

L-PERSIAN GULF

G-PHILADELPHIA

STANLEYVILLE II

CHESAPEAKE

J-TOAGORIKI

KOELLIKER

J-PARIS

J-MEDELLIN

G-CHINESA

J-FERRARA

RUSS

NORFOLK

UBE II

G-NORFOLK

J-BROUSSAIS

MANITOBA

C-INDONESIA

G-BALTIMORE

J-OXFORD

MEMPHIS

G-HONOLULU

SINAI-SEALY

SHIMONOSEKI

M-BOSTON

ETOBICOBE

N-IWATE

J-CAPETOWN

DAKAR

BIBBA

B). - POR DELECIÓN O SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LAS CADENAS  
BETA: (6).

TOKUCHI	S	C-HARLEM
C	C-GEORGETOWN	G-SAN JOSE
SIRIRAJ	PORTO ALEGRE	SOGN
J-BALTIMORE	D-BUSHMANN	G-COUSHATTA
E. SASKATOON	FREIBURG	E
G- TAIWAN-ANI	GENOVA	TOCAMA
PHILLY	HAMMERSMITH	G-GALVESTON
K-IBADAN	G-COPENHAGUE	J-BANGKOK
DHOFAR	HIKARI	N-SEATTLE
M-SASKATOON	ZURICH	SIDNEY
BRISTOL	M-MILWAUKEE	J-CAMBRIDGE
SEATTLE	C-HARLEM	KORLE-BU
STANLEYVILLE	J-IRAN	G-ACERA
D-IDADAN	SANTA ANA	BORAS
AGENIGI	SABINE	GUN HILL
M-HYDE-PARK	OAKRIDGE	N
N. BALTIMORE	KOLN	KEMPSEY
YAKIMA	KANSAS	NEW YORK
HIJIYAMA	D. PUJAB	C-ARABIA
HOFU	WIEN	HOPE
K-WOOLWICH	KENWOOD	RAINIER
R-DURHAMI		

C).- POR DELECIÓN O SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LAS CADENAS GAMMA: (6)

F-TEXAS I

F-TEXAS II

F-ALEXANDRA

HbF-JAMAICA

HbF-MALTA

F-HULL

D).- POR DELECIÓN O SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LAS CADENAS DELTA: (6).

A<sub>2</sub> SPHAKIA

A<sub>2</sub> FLATBUCH

A<sub>2</sub> BABINGA

2.- SINDROMES TALAEMICOS: Son provocados por reducción en el grado de Síntesis de una o más de las cadenas de los péptidos, como consecuencia de mutaciones o por carácter hereditario. Como ejemplos tenemos:

a).- TALAEMIA LADTIANA DELTA-BETA (1988): Causada por la desaparición de genes beta-globina lo cual incrementa la síntesis de la hemoglobina fetal. El punto de ruptura en éste caso es similar al que se presenta en la talasemia delta-beta Siciliana. (18)

b).- TALAEMIA -32 (C-A) (1992): Se presentó como una mutante de la beta-talasemia en un niño Chino cuya madre es Taiwanesa. (19)

### 3.- ALTERACIONES EN EL MECANISMO NORMAL DE SUSTITUCION DE LAS CADENAS POLIPEPTIDICAS, ESPECIALMENTE DE CADENAS GAMA POR BETA, EL CASO PARTICULAR DE LA PERSISTENCIA HEREDITARIA DE HOMOGLOBINA FETAL (HPFH) . (8)

Durante la vida adulta es normal la persistencia de una infima parte de Hemoglobina fetal dentro de las Células sanguíneas. La persistencia ( o en algunas ocasiones reaparición ) se encuentra por lo general en el desarrollo de hemoglobinopatías agudas, pero también puede presentarse en ausencia de cualquier síntoma patológico, delimitando el grupo de la así llamada persistencia hereditaria de hemoglobina fetal. (8)

Se han reportado casos aislados en super ( HPFH ) + gama-beta debido a una mutación específica G-202 bp 5' sobre la cubierta del gene G gama, en su región de mayor control de la expresión de la manifestación de éste gene. (8)

4.- HEMEPATIAS: Son aquellas hemoglobinas que presentan algún defecto en el grupo Heme ya sea por alguna de las siguientes razones:

- a).- Alteración en la unión del Hierro con la porfirina; como ejemplos tenemos: Las Metahemoglobinemias (ya sea congénitas o adquiridas).

La Sulfohemoglobina y la Metahemalbumina. ( 6 )

b).- Alteración en el grupo de las porfirinas (porfirias y porfinurias) (6).

c).- Alteración en el metabolismo de las porfirinas y del Hierro: Defectos de síntesis en anemias siderocársticas o aumento en el depósito de Hierro en hemosiderosis o Hemocromatosis. (6)

#### 5.- DEFECTOS EN EL METABOLISMO DE LA HEMOGLOBINA, INCLUYENDO ALTERACIONES EN SU CATABOLISMO. (6)

Existe otra clasificación atendiendo a los trastornos fisiológicos que puedan provocar, la cual es igualmente válida:

1.- Hemoglobinas que producen distorsión de los eritrocitos

2.- Hemoglobinas con aumento por la afinidad por el oxígeno

3.- Hemoglobinas con disminución por la afinidad por el oxígeno.

4.- Hemoglobinas asociadas con metahemoglobinemia

5.- Hemoglobinas Inestables.

Como podemos apreciar, la tecnología actual y los avances científicos han permitido descubrir gran variedad de hemoglobinas anormales; haciendo incapié en que la mayor parte de éstas, se ubican en individuos de ascendencia africana o asiática, repercutiendo tal vez los cambios ambientales sobre la manifestación de ciertos genes y en su secuencia de nucleótidos; situación que genera al transcribirse y traducirse ésta información, una secuencia de aminoácidos alterada en las cadenas de globina.

Entre las hemoglobinas anormales recientemente descubiertas y alteraciones patológicas asociadas con éstas tenemos:

- a).- Hb A<sub>2</sub>: Se encontró como componente mayoritario en la sangre de 15 niños ( de una muestra aleatoria de una población escolar de 456 ) en el valle de Jordán. Estos 15 casos representan tan solo un 3.3% de la población muestreada (1991). (23)
- b).- Hemoglobina H: Se encontró en tres miembros de una familia Italiana así como en una mujer blanca de Brasil de origen no asiático. (17) (27)

En el primer caso (1990) se determinó que la anomalía fué provocada por la desaparición de tres genes alfa-globina, encontrándose además otros tres miembros de la familia con persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (HPFH) mientras que un niño de 11 años de edad (miembro de ésta misma familia), reunía ámbos padecimientos. (17)

En el segundo caso (1989) la enfermedad se manifestó con una severidad moderada. El marcado de los genes demostró que la anomalía fué causada por la asociación de dos grupos anormales de genes alfa-globina sobre el cromosoma 16.

Estos datos ilustran la necesidad de estudios frecuentes a nivel molecular para el diagnóstico de éste grupo heterogéneo de enfermedades.

- c).- Hemoglobina Alfa 58 ( E 7 ) : Donde la histidina reemplaza a la Tirosina. (1989) (13)
- d).- Hemoglobina Beta-6: Glu toma el lugar de Lys. (1989). (13)
- e).- Hemoglobina Beta-26 (B 8): También Glu sustituye a la Lys (1989). (13)
- f).- Hemoglobina Chandigarh (1989): Se encontró en la India, en un individuo de 35 años de edad, padre de un niño talasémico. (20)

## II.2.- TALASEMIAS:

Son trastornos de tipo hereditario en los cuales se ve afectada la síntesis de alguna cadena normal de hemoglobina por lo cual la HbA se produce en poca cantidad siendo compensada por el aumento de algún tipo de hemoglobina anormal. (2) (3)

Por lo general la cadena afectada es la beta (beta talasemia) y raras veces las demás (alfa talasemia etc.). La desigual producción de cadenas peptídicas origina un trastorno en la estabilidad de la hemoglobina ya que las cadenas presentes en mayor cantidad no encuentran "pareja" para asociarse, precipitando así en los eritrocitos e incluso en los eritroblastos, trayendo como consecuencia la rápida destrucción de las células defectuosas (42) e incluso se ha reportado una dificultad en la capacidad de llenado de la vejiga (Hipostenuria) debida probablemente a que al polimerizar la hemoglobina S se propicia una oclusión microvascular de la vasa recta de la médula renal (14).

Las talasemias se encuentran entre las alteraciones genéticas mas extendidas por el mundo.

La alfa talasemia, la beta talasemia, las hemoglobinas E y Constant Spring son mutaciones comunes en el sur-este de asia (29), así por ejemplo en Taiwan los casos de alfa talasemia son alteraciones genéticas no poco comunes donde se ha utilizado (en los estudios efectuados) una preparación de hemoglobina H modificada para estudios de prevalencia los cuales revelaron una incidencia global de 3.4% y específicamente una incidencia de 0.4% en los individuos de ascendencia China y de 4% en los de origen Taiwanés. (26)

De la misma manera, otros estudios que se reportan realizados en una población de la India (Dungapur, distrito de Rajasthan) revelaron una incidencia total de 2.4% en la población muestreada (2), mientras que otro estudio realizado en niños de un población escolar del valle de Jordán reveló la persistencia de 3.3% de beta talasemia menor, 3.5% de alfa talasemia, 0.44% de drepanocitosis así como 0.89% de eliptocitosis hereditaria. (23)

El diagnóstico de talasemias y de los portadores de algunas hemoglobinas anormales son determinantes en la identificación de parejas de alto riesgo quienes deberán prever un estudio como diagnóstico prenatal. (29)

La determinación de cualquier enfermedad talasémica tales como la enfermedad por hemoglobina H, homocigosis en la beta talasemia y la conjunción de beta talasemia con HbE puede llevarse a cabo fácilmente a partir de los resultados de laboratorio clínico, modificaciones de los índices hematológicos y de la electroforesis de hemoglobina. Pero el diagnóstico para los portadores de talasemia es complicado y en algunas ocasiones son necesarias técnicas muy sofisticadas de síntesis de proteínas in vitro y análisis de DNA (29).

Las talasemias ( o "anemias Mediterráneas" ) pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

- 1.- **TALASEMIA MAYOR:** También llamada alfa-talasemia o enfermedad de Coley, se caracteriza por la falta o deficiencia en la formación de las cadenas alfa, como éstas se encuentran presentes en las hemoglobinas

normales su disminución favorece la formación de cuatro cadenas iguales, si éstas son gama se formará la hemoglobina de Bart (gama 4) y si son beta se formará la hemoglobina H (beta 4), la primera se presenta en el niño mientras que la segunda es mas frecuente en el adulto.

Los homocigotos presentan grandes cantidades de hemoglobina de Bart y parecen incompatibles con la vida después de 7 a 8 1/2 meses de edad gestacional. El curso de la enfermedad es grave (letal), no siendo el todo posible un tratamiento.

La esplenectomía puede ayudar, los pacientes infantiles con esta enfermedad presentan además de anemia crónica hemolítica grave lo siguiente: Esplenomegalia evidente, cráneo en cepillo así como numerosos eritroblastos en el frotis sanguíneo, anisocitosis (células de Diana) y aumento en la resistencia osmótica de los eritrocitos.  
(1) (42)

- 2.- TALASEMIA MENOR (también llamada Beta Talasemia) : Se caracteriza por una disminución en la síntesis de las cadenas beta por lo que la hemoglobina  $A_1$  se encuentra disminuida en cantidad, habiendo un exceso de cadenas alfa éstas se combinan con las delta y gama, produciendo una elevación en los niveles de hemoglobina  $A_2$  y fetal.  
(3) (42)

Esta anemia es propia de los heterocigotos. se presenta en forma atenuada, a pesar de haber anemia no es grave, a pesar de una elevada hemólisis. No es raro la presencia de un pequeño tumor esplénico, las alteraciones en los eritrocitos no son tan drásticas como en la talasemia mayor, sin embargo el contenido de hemoglobina en los eritrocitos es inferior al normal, apareciendo eritroblastos en los frotis sanguíneos.

3.- DELTA-TALASEMIA: Se caracteriza por una dificultad en la síntesis de las cadenas delta, por lo que la hemoglobina  $A_2$  desaparece casi por completo. (1)

4.- GAMA-TALASEMIA: Se caracteriza por una deficiencia en la síntesis de cadenas gama, por lo que hay una disminución de la hemoglobina fetal con la consiguiente dificultad para sobrevivir durante la gestación. (1)

Varios tipos de Talasemias o de persistencia hereditaria de hemoglobina fetal son causadas por la desaparición de grupos de genes de la beta-globina humana. La mayor parte de éstas lesiones de nivel molecular revelan una clara relación en lo que concierne tanto al tamaño como a la localización de sus puntos de ruptura. Esto nos puede indicar mecanismos comunes de recombinación los cuales son responsables de generar tales desapariciones. así por ejemplo la Talasemia Belga super (G) gamma super (+) (super) (A) (gama delta beta) super (O) es el resultado de una gran desaparición extendida del grupo de genes beta globina en 3' del gene super (A) gama. (21) (22)

En la Talasemia Laotiana se determinó el punto de ruptura 5' en el IVS II del gene delta-globina, entre las posiciones 775 a 781, muy similar al punto de ruptura 5' de la talasemia Siciliana delta-beta. (18)

De ésta forma, mediante el marcado de los genes y estudios a nivel molecular, se han podido identificar cada día más mutantes de la hemoglobina, especialmente en pacientes con antecedentes de algún tipo de Talasemia (16).

### II.3.-HEMOGLOBINAS ANORMALES EN MEXICO:

Los antecedentes que se tienen en México acerca de individuos portadores de Hemoglobinas anormales o con trastornos en su síntesis se iniciaron en 1950 con la observación de Muñoz y Lavalle de un paciente con drepanocitosis estudiado en el Hospital Infantil de México. (4) (36)

A partir de 1960 con Lisker, se efectuaron las primeras encuestas orientadas a descubrir éste tipo de transtornos genéticos en diferentes tipos de poblaciones y se difundieron las técnicas básicas para identificarlos, de manera que el número de casos descubiertos aumentó en forma considerable. (5)

En consecuencia, la información acerca de individuos portadores de hemoglobinas anormales la tenemos expuesta en la tabla No. 2 en la cual podemos notar que la variante de hemoglobina anormal en contrada con mayor frecuencia en nuestro país es la Hemoglobina S, localizada principalmente entre los habitantes de las costas del Golfo y del Pacífico. (5) (32)

El trastorno hereditario de la Hemoglobina que ocupa el segundo lugar en frecuencia es la Beta-talasemia, no obstante reportes de sujetos dobles heterocigotos para ambas anormalidades. (33) (34) (35)

Sin embargo, la información acerca de Hemoglobinas anormales en México se ha dividido en dos grupos:

- a).- Poblaciones indígenas, mestizas e intrahospitalarias
- b).- Pacientes aislados con problema de anemia hemolítica

Estudios realizados a 2336 personas de ascendencia Indígena revelaron tan solo cuatro casos de hemoglobinas anormales (0.17%). (37)

Por otro lado, los estudios realizados en poblaciones indígenas híbridas de las costas del Golfo y del Pacífico demostraron una incidencia variable de heterocigotos de la hemoglobina S así como otros tipos de anormalidades hemoglobínicas, de un total de 4631 casos estudiados se presentaron 214 con anormalidades (4.62%). (6)

Los estudios realizados en poblaciones intrahospitalarias de Puebla y Guadalajara revelaron tan solo un 0.34% de hemoglobinas anormales (26 casos de 7554 estudiados). (6)

En los pacientes con problemas de anemia hemolítica, la hemoglobina anormal que se presenta con mayor frecuencia es la hemoglobina S, identificándose además otras dos llamadas hemoglobina México y hemoglobina Chiapas, cuyas características principales se resumen a continuación: (6)

## 1.-Hb MEXICO:

- a).- Migra más rápido que la HbA en electroforesis en papel a pH=8.6.
- b).- No se separa totalmente de la HbA en la electroforesis en papel a pH=6.5 mientras que tiene una velocidad de migración idéntica a la de ésta a pH=8.6 pero utilizando como soporte agar-gel.
- c).- Las determinaciones cuantitativas usando el bloque de almidón en electroforesis y la columna de cromatografía en IRC-50 amberlita muestran que están constituidas por un 20% de la hemoglobina total en cada caso.

## 2.-Hb CHIAPAS:

Se ha determinado que la anomalía de ésta hemoglobina se presenta en la posición 114 de la cadena alfa, donde la Arginina sustituye a la prolina.

Desde el punto de vista electroforético podemos decir lo siguiente:

- a).- Se desplaza mas lentamente que la HbA, mientras que no se observa desplazamiento del componente A<sub>2</sub> a pH alcalino (8.2) utilizando como soportes papel o gel de almidón.

b).- Si se utiliza como soporte Agar-gel se mueve ligeramente adelante de la HbA.

c).- Solo ha sido descubierta en forma heterocigota con la Hb A y al igual que la Hb México, se desconocen los síntomas que ocasionaría al estar en estado homocigoto o en forma heterocigota con otra hemoglobina anormal.

Sin embargo, es importante conocer la posible incidencia de Hemoglobinas anormales en una población sana de personas de la Ciudad de México y Área Metropolitana, a fin de conocer su frecuencia y significancia.

T A B L A   N U M E R O   2

LISTA DE HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS ENCONTRADAS EN MEXICO (6)

NOMBRE	Nº.CASOS	ORIGEN ETNICO
MEXICO ( $\alpha$ 54 GLI-GLU)	3	MEXICANO
CHIAPAS ( $\alpha$ 114 PRO-ARG)	2	MEXICANO
TARRANT ( $\alpha$ 126 ASP-ASN)	2	MEXICANO
S ( $\beta$ 6 GLU-VAL)	212	MEXICANO AFRICANO HOLANDES
C ( $\beta$ 6 GLU-LYS)	11	MEXICANO
G-SAN JOSE ( $\beta$ 7GLU-GLY)	1	MEXICANO
J-BALTIMORE ( $\beta$ 16 GLY-ASP)	1	MEXICANO
E ( $\beta$ 26 GLU-LYS)	1	MEXICANO
FANNIN-LUBBOK ( $\beta$ 119 GLY-ASP)	1	MEXICANO
RIYADH ( $\beta$ 120 LYS-ASP)	3	MEXICANO
D-LOS ANGELES ( $\beta$ 121 GLU-GLN)	1	MEXICANO

## TALASEMIAS:

ENFERMEDAD H	3	MEXICANO
ALFA-TALASEMIA	6	MEXICANO
BETA-TALASEMIA HOMOCIGOTA	5	MEXICANO
BETA-TALASEMIA	17	LIBANES
TALASEMIA COMBINADA CON HbS	2	MEXICANO LIBANES
HbS-HPFH	1	MEXICANO
HbE-TALASEMIA	1	MEXICANO
HPFH	3	MEXICANO

### III.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO PARA LAS HEMOGLOBINAS NORMALES Y ANORMALES.

Las técnicas empleadas para el diagnóstico e identificación de las hemoglobinopatías son múltiples y desde luego, unas más confiables o más elaboradas que otras. Entre las técnicas más comunes tenemos las siguientes:

1.- **CROMATOGRAFIA:** Se utiliza la técnica en columna, los adsorbentes recomendados son: DEAE celulosa, amberlita IRC 50 así como la carboximetil-celulosa. (6)

Mediante éste método se han encontrado altos niveles de hemoglobina fetal en pacientes con síndrome mielodisplástico (MDS) (25).

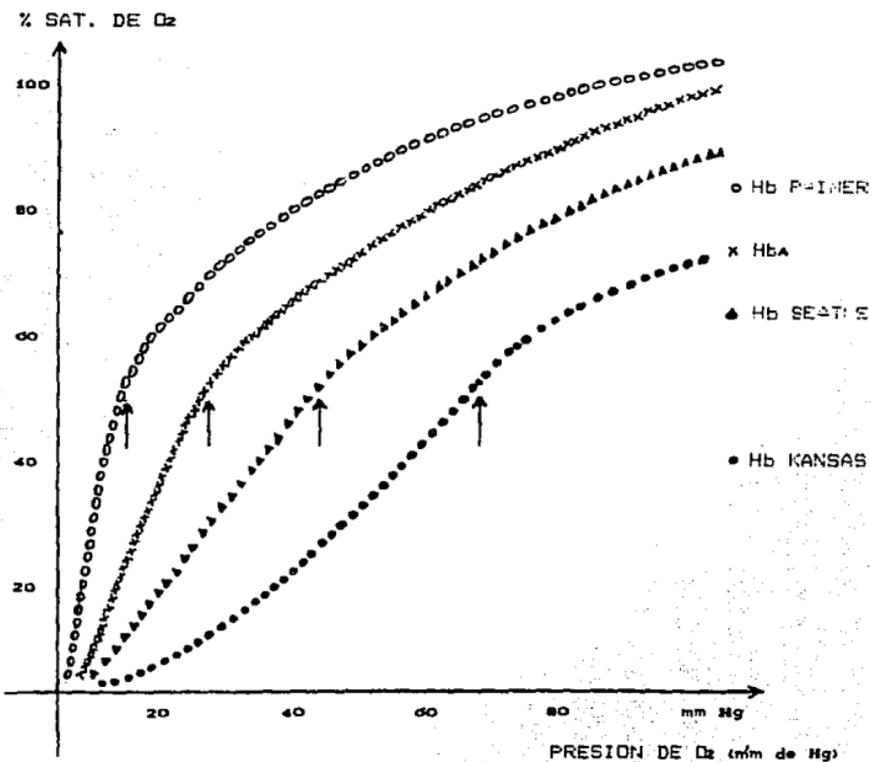
2.- **TECNICAS DE CURVAS DE SOLUBILIDAD O AFINIDAD POR EL OXIGENO:** Cuando la Hemoglobina se transforma de su forma reducida a oxidada debido a un tratamiento a diferentes presiones parciales de oxígeno, se obtiene una curva de tipo sigmoidea, la cual varía cuando se trata de otros tipos de hemoglobina (ver la gráfica No. 2 ). (6) (45)

3.- **INMUNELECTROFORESIS Y DIFUSION SOBRE GEL.** (6)

- 4.- ESPECTROFOTOMETRIA: Las diversas hemoglobinas presentan picos de absorbancia a diferentes longitudes de onda las cuales se hacen mas evidentes en la región del ultravioleta. (6)
- 5.- MICROSCOPIA ELECTRONICA: Es de especial ayuda en la formación de cristales de Hemoglobina S de la anemia falciforme.
- 6.- TECNICA DE HIBRIDACION: Se basa en la desnaturalización y renaturalización de las cadenas alfa y beta. Mediante éste método se han logrado detectar algunas alteraciones de dichas cadenas. (6)

## GRAFICA NUMERO 2

### CURVAS DE SOLUBILIDAD O SATURACION EN OXIGENO PARA DIVERSAS HEMOGLOBINAS (45)



7.- **ELECTROFORESIS:** Es uno de los métodos mas completos ya que la mayoría de las hemoglobinas anormales pueden ser identificadas.

De acuerdo con la carga eléctrica que presente la hemoglobina en estudio será su corrimiento en un campo electroforético.

En particular, éste trabajo está orientado a realizar un análisis electroforético por lo cual se tratará el tema con mayor profundidad posteriormente. (15) (28)

8.- **RECIENTEMENTE SE HA VALIDADO UN SISTEMA ESPECIALIZADO: "ES"** el cual relaciona la significancia de los síndromes talasémicos con la deficiencia de Hierro. Dicha validación se ha desarrollado de acuerdo con la eficacia de éste sistema para detectar Talasemias y hemoglobinopatías en 1671 mujeres y 1490 varones en un laboratorio.

Todos los 845 casos de microcitosis encontrados entre ellos fueron utilizados para estimar las frecuencias reales de los grupos de diagnóstico así como identificados por el ES (Micro Hema Screen). La detección de microcitosis puede ser útil como un método rápido de obtener y procesar datos de un analizador automático. Este puede aplicarse en las discersión tanto de talasemias como deficiencias de Hierro como una estimación primaria dentro del laboratorio o como un método de diagnóstico computarizado de una población. (30)

### III.1.- METODO ELECTROFORETICO:

La electroforesis es el estudio (analítico) del movimiento de moléculas cargadas en un campo eléctrico. La técnica que ha sido utilizada por los bioquímicos por lo menos durante los últimos cincuenta años, es especialmente aplicable en la caracterización y análisis de biopolímeros. La migración de las moléculas en un campo eléctrico es influenciada por el tamaño, forma, carga y naturaleza química de la molécula. (43)

Las técnicas de electroforesis pueden ser clasificadas como Electroforesis libre y Electroforesis de zona.

En la electroforesis libre se somete a un campo eléctrico una solución de la macromolécula en un buffer acuoso dentro de una celda cerrada. La proporción de la migración de las macromoléculas es medido mediante la observación directa de la zona límite de separación de las moléculas respecto al solvente puro. Debido a serios problemas experimentales, causados principalmente por el manejo de las muestras ( por ejemplo el mezclado de estas debido a la convección o vibración, difusión de las mismas, etc. ) esta modalidad de la electroforesis no permite por si misma ser un buen método de rutina analítica y es rara vez utilizada en la actualidad. (43)

Las técnicas de electroforesis de zona superan la mayoría de éstos problemas por el empleo de una solución buffer saturada así como un medio electroforético de soporte. La muestra a ser analizada se aplica sobre el medio de manera de dejar sobre éste una pequeña mancha o una banda muy tenue. La migración de las moléculas es influenciada por la aplicación de un campo eléctrico y la naturaleza íntima del soporte. Aún cuando es difícil cuantificar el movimiento electroforético de moléculas en un soporte sólido, la electroforesis de zona ha logrado una gran aceptación como método de purificación y determinación del tamaño de las biomoléculas. (43)

El movimiento de una molécula cargada sujeta a un campo eléctrico está dado por la siguiente ecuación: (43)

$$E q = f v$$

En la cual:

E = Campo eléctrico ( en volts/cm. )

q = Carga neta de la molécula

f = Coeficiente de fricción, el cual depende principalmente de la masa y de la conformación de la molécula.

v = Velocidad de la molécula.

La partícula cargada se mueve a una velocidad constante la cual depende directamente de la fuerza eléctrica ( $E q$ ) y es inversamente proporcional a la concentración que repercute en la viscosidad ( $f$ ). La velocidad de la molécula cargada se determina mediante la siguiente ecuación: (43)

$$v = \frac{E q}{f}$$

El campo eléctrico aplicado durante la electroforesis (el cual está representado en la ecuación como "  $E$  " ) generalmente se mantiene constante durante el proceso. Bajo estas condiciones, el movimiento de la molécula cargada depende de la relación carga/masa ( $q/f$ ). Recordemos que el coeficiente de fricción de una molécula es una medida de su masa y conformación. (43)

El movimiento de una partícula cargada en un campo eléctrico se entiende generalmente en términos de "movilidad",  $\mu$ , así la siguiente ecuación nos expresa la velocidad por unidad de campo eléctrico: (43)

$$\mu = \frac{q}{f}$$

Teóricamente, si conocemos la carga eléctrica neta de una molécula ( $q$ ) nos sería posible medir " $f$ " y por lo tanto obtener la información acerca de la facilidad de desplazamiento en medio acuoso y forma de la molécula mediante el estudio de su movilidad dentro de un campo eléctrico. Pretender definir " $f$ " por electroforesis no ha sido satisfactorio, principalmente porque la última ecuación no se puede aplicar adecuadamente al proceso electroforético. Existen factores muy importantes que no están comprendidos en ésta ecuación como son por ejemplo la interacción de las moléculas en migración con el medio de soporte y el solvatación de las moléculas por los iones de la solución buffer. Esto quiere decir que la electroforesis no se utiliza comúnmente para conocer detalles específicos acerca del tamaño y forma de una molécula. (43)

Por el contrario, ha sido aplicada al análisis de pureza e identificación de macromoléculas. Se supone que cada molécula de una mezcla tiene su propia carga y tamaño y por lo tanto su movilidad en un campo eléctrico será característica. Esta suposición constituye la base para el análisis y separación por cualquier método electroforético. La técnica es utilizada especialmente en el análisis de aminoácidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos. (43)

El factor que varía en cada método electroforético es el tipo de medio de soporte el cual puede ir desde el papel hasta los diversos tipos de Gel. A continuación trataremos el método electroforético en acetato de celulosa, por haber sido el utilizado en el presente trabajo. (43)

### III.2- ELECTROFORESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA.

Cuando se recurre a ésta modalidad de medio de soporte electroforético se procede de manera similar a la cromatografía en papel; la muestra a ser analizada se coloca como una mancha o banda por la parte media de la tira de acetato de celulosa. Se conocen dos técnicas para la aplicación de la muestra, la aplicación en seco (en la cual la tira se impregna previamente en el buffer y se deja secar para posteriormente colocar la muestra) y la vía húmeda (en la cual la muestra se aplica sobre la tira humedecida en la solución buffer). El método en seco da como resultado manchas mas pequeñas pero una mejor resolución que por la vía húmeda; sin embargo éste último método es mas facil de ejecutar, además se recomienda porque favorece la inducción de la sustancia a analizar. (43)

Posteriormente a la aplicación de la muestra la tira de acetato de celulosa se coloca en la cámara de electroforesis de tal forma que los extremos de aquella queden sumergidos en contenedores separados estableciendo una especie de "puente de contacto". Después se conecta la cámara a una fuente de poder y se aplica un cierto voltaje. (43)

La cantidad de tiempo necesario en una electroforesis depende entre otras muchas razones del medio de soporte, la naturaleza de la muestra, el voltaje aplicado así como las dimensiones de las tiras y con frecuencia se hacen necesarias algunas pruebas preliminares a fin de encontrar el periodo de tiempo mas adecuado, sin embargo, para la mayoría de los casos es suficiente de 45 minutos a una hora. (43)

Una vez que ha concluido el corrimiento electroforético, el revelado de los componentes de la muestra se puede efectuar ya sea rociando o sumergiendo las tiras en una solución colorante.

El reactivo empleado para tal efecto dependerá desde luego de la naturaleza química de la muestra. (43)

Aunque la electroforesis en acetato de celulosa no difiere mucho de la electroforesis en papel cada medio de soporte tiene sus propias características y limitantes, así por ejemplo la electroforesis en papel se utiliza rara vez en la actualidad excepto en el análisis de pequeñas moléculas cargadas tales como los aminoácidos, péptidos, y nucleótidos, debido a que este tipo de moléculas presentan cargas pequeñas, la movilidad electroforética es baja a menos que se apliquen altos voltajes lo cual complica el corrimiento pues se provoca un exceso de calor dando como resultado una evaporación del buffer así como el secado de la tira de papel, esto puede resolverse colocando la tira entre dos placas de vidrio o ejecutando el corrimiento en una cámara en refrigeración. (43)

Los múltiples grupos hidroxilo de la celulosa (del papel) dan lugar a una profunda interacción entre las macromoléculas polares y la tira de papel para electroforesis. Debido a esto las proteínas hidrofílicas y ácidos nucleicos tienden a presentar una baja movilidad electroforética. La acetilación de los grupos hidroxilo de la celulosa da como resultado el Acetato de celulosa el cual mejora considerablemente la separación electroforética de macromoléculas polares. El acetato de Celulosa presenta algunas otras ventajas sobre la celulosa, incluyendo un menor tiempo de análisis con mejor resolución, detección de muestras aún más pequeñas debido a un moderado contraste de fondo así como el uso de voltajes más bajos. Los aparatos necesarios para efectuar una electroforesis en papel o en acetato de celulosa son relativamente simples y hasta pueden ser diseñados para uso escolar. Sin embargo se puede disponer en el comercio de modelos prácticos y económicos. (43)

### III.3.- ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA.

Las moléculas de hemoglobina en una solución alcalina tienen una carga negativa neta y se mueven hacia el ánodo, en un sistema electroforético, a una velocidad proporcional a la fuerza de su carga. Las que tienen una movilidad electroforética mayor que la hemoglobina A a un pH de 8.6 en una solución de barbital se conocen como " Hemoglobinas rápidas "; éstas incluyen la hemoglobina de Bart y las dos más rápidas: la Hb<sub>H</sub> y la Hb<sub>I</sub>. La Hb<sub>C</sub> es la más lenta de las hemoglobinas corrientes. Citando en orden ascendente a las que presentan mayor movilidad tenemos: Hb<sub>A2</sub>, Hb<sub>E</sub>, Hb<sub>O</sub>, Hb<sub>D</sub>, Hb<sub>S</sub>, Hb<sub>L</sub>, Hb<sub>G</sub>, y Hb<sub>A</sub>.

La electroforesis en acetato de celulosa requiere menos hemolizado, es más rápida y permite prácticamente las mismas separaciones. La electroforesis con gel de almidón y en bloque de almidón da unas separaciones más netas y es muy útil para la óptima cuantificación de la Hb<sub>A2</sub> (pueden recortarse las bandas para después eluirles y medirse por su densidad óptica), pero su empleo es más complicado. El gel de agar es, al parecer, el mejor para la separación electroforética de la Hb<sub>F</sub>. (46)

Para la cuantificación de la Hb<sub>A2</sub>, el método de bloque de almidón de Kunkel y Cole (1957) es tal vez el más adecuado. (46)

Ejemplos de otros métodos que son algo más cómodos para el trabajo habitual en el laboratorio clínico son el del acetato de celulosa (Marengo Rowe 1965), la cromatografía de celulosa DEAE (Huisman y Dozy, 1961) con el gel de almidón (Aksoy y Erdem, 1965) y con el gel de agar (Yakulis y Cos, 1960). (46)

Se pueden disponer de distintos tipos de aparatos para las electroforesis de las hemoglobinas. Se aplica el hemolizado a un medio de soporte dentro de la cámara que tiene una solución amortiguadora, y se aplica un voltaje constante. Los diferentes medios y soluciones varían en cuanto a la eficacia de la separación. Ninguno es a la vez práctico y adecuado para todas las separaciones y para propósitos de diferenciación. (46)

La electroforesis en papel filtro con una solución buffer de barbital es sencilla y satisfactoria para el trabajo habitual, y da las separaciones indicadas pero no muestra la  $Hb_{A_2}$ . Una solución tris permitirá la detección de pequeñas fracciones de hemoglobina, incluyendo la  $Hb_{A_2}$ , pero es menos satisfactoria para separar la  $Hb_{\beta}$  de la  $Hb_{\alpha}$  de la  $Hb_{\gamma}$ . (46).

Una caracterización final de las hemoglobinas anormales está fuera del alcance de un laboratorio clínico en trabajos habituales. Hacen falta una purificación de la hemoglobina anormal mediante electroforesis con bloque de almidón; Experimentos de hibridación para determinar si la anomalía está en la cadena alfa o la beta así como la "toma de huellas dactilares". En este último proceso, las cadenas polipeptídicas se descomponen, mediante digestión enzimática, en péptidos, que se separan haciendo una electroforesis sobre papel horizontal, seguida de una cromatografía vertical. Este mapa de los péptidos o "impresión dactilar" se compara con el de la hemoglobina normal, y puede localizarse el péptido en el que hay una anomalía. Luego se eluye el péptido anormal y se determina su contenido en aminoácidos. (46)

### III.4.- DIAGNOSTICO PRENATAL DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS:

Recientemente se han revisado las pruebas de diagnóstico para las hemoglobinopatías más comunes, de tales técnicas se ha dado una breve descripción al inicio de este capítulo, y se consideran avances recientes en el análisis estructural de diversas hemoglobinas. (44)

De rutina y como novedad se han implementado otros métodos los cuales pueden aplicarse en el diagnóstico de anemias con células anormales.

Por lo que respecta al diagnóstico prenatal de las hemoglobinopatías, el método convencional consiste en el marcado específico de las cadenas de DNA coriónico y marcando radiactivamente genes de prueba.

Un perfeccionamiento de la técnica involucra la amplificación selectiva de fragmentos de DNA lo cual nos permite detectar las porciones alteradas sin necesidad de recurrir a la radiactividad y aún hasta dos días después de haber recolectado la muestra. (7)

Sin embargo, en nuestro país no se tiene hasta la fecha información de algún programa orientado al diagnóstico prenatal de la hemoglobinopatías, la información de la cual se dispone nos indica que tales programas se han comenzado en la ciudad de Rochester N. Y. donde las pacientes han mostrado interés en conocer su información genética y las pruebas se han aplicado sin costo alguno. Cuando se identifica a alguna mujer como portadora ésta se encontrará ante tres alternativas: Primera: Si acepta la oportunidad de realizarle algún estudio más profundo y su respectivo tratamiento. Segunda: Si desea que su pareja también sea sometida a pruebas, en caso de tener un resultado positivo se recurriría a la tercera alternativa: Aceptar algún diagnóstico prenatal del bebé. (9) (10) (11) (12)

No obstante, lo que se puede aprender acerca del diagnóstico prenatal aplicado, es poco prometedor, especialmente en lo que se refiere a diagnóstico genético aplicado, en éste tipo de estudios se toman en cuenta cinco factores principales con la finalidad de tener una alta confiabilidad al concluir, dichos factores son: Tener pacientes jóvenes, que tengan la mayor formación académica posible, su conocimiento de tener antecedentes familiares antes de su identificación, conocimiento del padre del bebé acerca de tener antecedentes familiares antes del tratamiento así como ser primerizas. (10)

Actualmente dichos estudios se están completando, la finalidad de los mismos es comparar la eficacia de las precauciones y cuidados básicos con la experiencia de especialistas en genética en términos de casos positivos individualmente tratados, lo importante de lo que aprende el paciente así como estimar la frecuencia con la que las parejas se someten a pruebas. (9)

Este tipo de estudios es de gran importancia pues estadísticamente se ha encontrado que ( en los Estados Unidos ) una de cada 625 parejas de negros corre el riesgo de tener un bebé con algún tipo de talasemia. El diagnóstico prenatal de la mutación de células en hoz es posible tan solo en pocas horas. La zona en torno a la mutación falciforme es amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y es digerida por una endonucleasa cuyo sitio específico de acción es anulado por las mutaciones A a T en el codón 6 del gene falciforme y los fragmentos anormales resultantes se detectan marcándolos con un compuesto bromado después de la electroforesis. La detección de las mutaciones G a A en el codón 6 del gene de la hemoglobina C es sin embargo más difícil ya que no se conoce si el sitio de acción de la endonucleasa es anulado o creado por la mutación y usualmente requiere hibridación oligonucleótica alelo-específica. (15)

Esta rápida técnica de amplificación alelo-específica permite la detección de la mutación de la hemoglobina C en un tiempo mucho más breve que cualquier otro de los empleados para detectar la mutación en la hemoglobina S. (15)

## IV.- OBJETIVOS.

### IV.1.- OBJETIVO GENERAL:

Efectuar un estudio electroforético en una muestra de una población humana residente en el Distrito Federal y área metropolitana con la finalidad de detectar a través de éste método algún caso de alteración en la hemoglobina.

### IV.2.- OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Estimar la Electroforesis como método eficaz para la separación e identificación de hemoglobinas.
- 2.- Aplicación de la electroforesis como método de diagnóstico de las principales hemoglobinopatías.
- 3.- Aplicación de un análisis estadístico sencillo a los resultados obtenidos.
- 4.- Realizar dos pruebas hematológicas paralelas (frotis sanguíneo y Hematocrito) para apoyar la confiabilidad de éste estudio.
- 5.- Concluir respecto a las hemoglobinopatías detectadas en el trabajo de acuerdo con la población muestreada.

## V.- MATERIALES Y METODOS

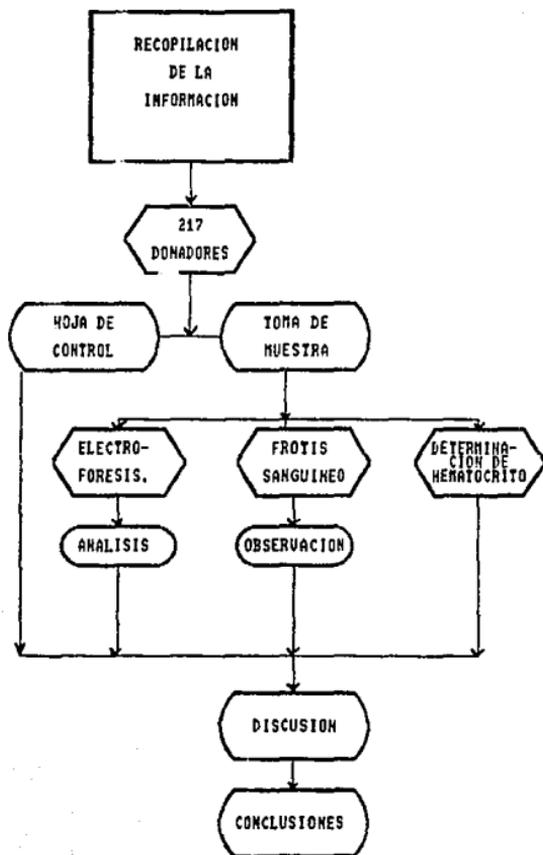
### V.1.- MATERIAL BIOLÓGICO:

Se obtuvieron muestras de sangre por punción dactilar en 217 donadores voluntarios.

El diagrama de flujo de la Figura No. 2 nos ilustra los pasos que se siguieron, posteriormente aparecen las hojas de registro que nos muestran los datos recabados para cada donador.

**F I G U R A   N o .   2**

**DIAGRAMA DE FLUJO DEL PRESENTE  
TRABAJO DE INVESTIGACION.**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN UNAM.  
 DIVISION DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS  
 DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
 SECCION BIOQUIMICA GENETICA

TRABAJO DE TESIS: "PERFIL ELECTROFORETICO DE ALGUNAS HEMOGLOBINOPATIAS EN PERSONAS DE LA CIUDAD DE MEXICO Y AREA PETROPOLITANA"

DIRIGIDA POR: G. F. B. MARIA ESTHER REVUELTA MIRANDA

ELABORADA POR: P.D.F.B. VICTOR HUGO MEJIA MANCILLA.

HOJA CONTROL DE PACIENTES DONADORES

FECHA: \_\_\_\_\_ DONADOR NUMERO: \_\_\_\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_

Ocupacion \_\_\_\_\_ SEXO: ( ) MASC. ( ) FEM.

EDAD: \_\_\_\_\_ AÑOS \_\_\_\_\_ MESES. ESTATURA: \_\_\_\_\_ PESO: \_\_\_\_\_

DOMICILIO: \_\_\_\_\_

CALLE	No. EXT.	No. INT.
COLONIA	DELEGACION O MUNICIPIO	
CIUDAD O ESTADO	CODIGO POSTAL.	TELEFONO

1.- INDIQUE POR FAVOR LAS ENFERMEDADES PADECIDAS (QUE SEAN DE IMPORTANCIA CLINICA) DURANTE SU:

<u>INFANCIA</u>	<u>ADOLESCENCIA</u>	<u>JUVENTUD</u>

2.- DATOS REFERENTES A LA ASCENDENCIA (INDIQUE EL LUGAR DE NACIMIENTO Y RAZA).

ABUELO PATERNO: \_\_\_\_\_

ABUELA PATERNA: \_\_\_\_\_

ABUELO MATERNO: \_\_\_\_\_

ABUELA MATERNA: \_\_\_\_\_

OTROS (QUE SEAN DIRECTOS)

\_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_

3.- ANTECEDENTES PATOLOGICOS FAMILIARES:

<u>PADRE</u>	<u>MADRE</u>	<u>HERMANOS</u>	<u>OTROS</u>
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

4.- COSTUMBRE ALIMENTICIAS PERSONALES:

<u>DESAYUNO</u>	<u>COMIDA</u>	<u>CENA</u>	<u>OTROS</u>
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

INDIQUE CUANTAS VECES A LA SEMANA CONSUME LOS SIGUIENTES ALIMENTOS:

LEITE: \_\_\_\_\_ CARNE: \_\_\_\_\_ HUEVO: \_\_\_\_\_ OTRAS PROTEINAS: \_\_\_\_\_

5.- PADECIMIENTOS ACTUALES:

- |                |                   |
|----------------|-------------------|
| ( ) DIGESTIVOS | ( ) RESPIRATORIOS |
| ( ) CUTANEOS   | ( ) NERVIOSOS     |
| ( ) CARDIACOS  | ( ) RENALES       |
| ( ) SANGUINEOS | ( ) OSEOS         |
| ( ) ANIMICOS   | ( ) INFECCIOSOS   |
| ( ) MUSCULARES | ( ) OTROS.        |

ESPECIFIQUELOS TODOS POR FAVOR:

---

---

---

---

LA INFORMACION QUE HA TENIDO A BIEN PROPORCIONARNOS SERA TRATADA CON CARACTER DE TIPO EXTRICTAMENTE CONFIDENCIAL. "MIL GRACIAS POR SU COLABORACION".

RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LAS MUESTRAS

FECHA DE ELABORACION: \_\_\_\_\_ TIEMPO DE ALMACENAMIENTO \_\_\_\_\_

% DE HEMATOCRITO: \_\_\_\_\_ MORFOLOGIA CELULAR: \_\_\_\_\_

ELECTROFORESIS:

- DISTANCIA DE DESPLAZAMIENTO DE LA Hb: \_\_\_\_\_ Cms.
- VOLTAGE: \_\_\_\_\_ - INTENSIDAD: \_\_\_\_\_
- BUFFER: \_\_\_\_\_ - pH: \_\_\_\_\_ TIEMPO: \_\_\_\_\_

OBSERVACIONES ADICIONALES: \_\_\_\_\_

CONCLUSIONES RESPECTO AL DONADOR: \_\_\_\_\_

## V.2- DESARROLLO EXPERIMENTAL:

El total de las muestras analizadas provinieron de donadores sanos, estudiantes o trabajadores de la "FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN"

El análisis electroforético de los hemolizados se realizó utilizando una solución buffer de tris-barbital de pH = 8.6 y como soporte acetato de celulosa.

En cada tira de acetato de celulosa se corrieron simultáneamente una muestra de hemoglobina A<sub>1</sub> (stándard) y otra de Hemoglobina fetal (HbF) como parámetro de control.

Cabe añadir que además del análisis electroforético se realizó en dos pruebas más a cada muestra de sangre de cada donador, las cuales también fueron registradas como puede apreciarse en la hoja de control.

Primeramente se realizó un frótis sanguíneo el cual fue teñido mediante el método de Geimsa con el fin de detectar anomalías en los eritrocitos, tales como: Hipocromía (debido a una cantidad muy baja de hemoglobina), Poiquilocitosis (alteraciones en la forma) o anisocitosis (alteraciones en el tamaño), hemólisis etc.

Posteriormente se determinó el hematocrito en cada caso con el fin de tener un parámetro en el cual apoyarnos en el caso de resultar dudoso el análisis electroforético de alguna muestra.

### V.3.- EQUIPO:

- Lancetas estériles especiales para punción cutánea (Propper).
- Tubos capilares Heparinizados
- Aplicador de muestras
- Tiras de Acetato de Celulosa "Gelman" Sepraphore III 5.7 X 14.4 cms. For microzome <sup>TM</sup> system Cat. No. 51010.
- Portaobjetos
- Cubas de Tinción y Lavado
- Matraces, vasos de precipitados, pipetas y gradilla
- Frascos viales estériles para recibir y almacenar las muestras.
  
- APARATOS:
  
- Cámara de Electroforesis "Gelman" semi-micro chamber 500 ml. cap. Cat. No. 51212.
- Fuente de poder
- Microcentrífuga para hematocrito "Adams micro-hematocrit centrifuge" Clay-Adams, Inc. New York. Cat. 2900 115 V. 1.2 Amp. 60 Cycles ac. Serie No. M 9534A.

**- REACTIVOS:**

- Agua bidestilada
- Solución de Etanol al 70%
- Metanol Absoluto
- Solución de Ácido acético al 5%
- Solución de rojo de Ponceau S al 1% en ácido acético al 5%
- Solución colorante de Giemsa
- Solución buffer de Tris-barbital de pH 8.6 (2 volúmenes de 500 ml c/u )
- Tolueno
- Solución salina fisiológica

**V.4.- PROCEDIMIENTO:**

**V.4.1.- TOMA DE LAS MUESTRAS:**

Se procedió a desinfectar la yema de uno de los dedos índice o pulgar del donador empleando para ello una torunda humedecida en Etanol al 70%, a continuación se procedió a efectuar la punción dactilar.

Se recolectó la muestra de sangre completa, la primera gota se extendió sobre un portaobjetos para teñirla de acuerdo con la técnica de Giemsa. La siguiente parte de la muestra se recolectó in situ dentro de un tubo capilar heparinizado y se llevó a la centrifuga para determinar el hematocrito, por último se recolectaron 0.4 ml. dentro de un frasco vial estéril con el fin de prepararla para la electroforesis.

A CONTINUACION SE DESCRIBIRA DETALLADAMENTE CADA UNA DE ESTAS FASES:

V.4.2.- TINCION DEL FROTIS SANGUINEO POR EL METODO DE GIEMSA: (46).

- a).- Colocar una gota de sangre fresca sobre el portaobjetos (es preferible que sea la primera o segunda gota obtenida de la punción).
- b).- Con otro portaobjetos hacer un ángulo de  $45^{\circ}$  sobre la gota de sangre y extenderla con un solo movimiento suave y rápido.
- c).- Secar el frotis rápidamente al aire para evitar la hemólisis.

d).-Cubrir con la solución colorante de Giemsa durante 3 minutos.

e).-Enjuagar suavemente con agua destilada y dejar secar

f).-Fijar con Metanol durante 3 minutos y escurrir.

g).-Obsevar el frotis al microscopio con ayuda del objetivo de inmersión (100X).

Al hacer las observaciones al microscopio se busca la presencia de poiquilocitosis (alteración en la forma) o anisocitosis (alteración en el tamaño) de los eritrocitos las cuales aparecen en algunas anemias de tipo drepanocítico o falciforme debidas a ciertos tipos de hemoglobinas anormales.

Este sencillo análisis también nos ayuda a tener una idea acerca de si el donador presenta una anemia de tipo hipocrómica ( en tal caso los eritrocitos se encontrarán de un color pálido).

V.4.3.- DETERMINACION DEL HEMATOCRITO: (46)

- a).-Se recogió la muestra in situ dentro de un tubo capilar hasta aproximadamente 1 cm. antes del extremo. A continuación se procedió a sellar el tubo aplicando calor por el extremo seco.
- b).-Colocar los tubos dentro de la centrífuga cuidando que la parte sellada quede hacia afuera.
- c).-Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
- d).-Tomar la lectura dividiendo la longitud que ocupa el paquete celular entre la longitud del volúmen total de la muestra y multiplicar el cociente por 100, el resultado obtenido corresponde al hematocrito.

La importancia de ésta prueba estriba en que nos puede servir de apoyo para precisar la presencia de cierto tipo de anemias (por ejemplo las talasemias por lo general son de tipo hipocrómico), además si el plasma se observa de un color amarillo intenso nos revela cualitativamente un aumento en las bilirrubinas (característico también de algunos otros casos de anemia).

**V.4.4.- OBTENCION DE LOS HEMOLIZADOS QUE SE UTILIZARAN EN LA ELECTROFORESIS. (31)**

- a).-Colectar aproximadamente 0.5 ml. de sangre completa y guardar en frascos viales heparinizados almacenando a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- b).-Descongelar las muestras a temperatura ambiente, con el fin de evitar la hemólisis, minutos antes de la electroforesis.
- c).-Vaciar cada muestra en un tubo para centrifuga y agregar 7 ml. de solución salina fisiológica.
- d).-Mezclar bien y centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
- e).-Separar el sobrenadante
- f).-Añadir de nuevo solución salina fisiológica y mezclar despacio.

g).- Repetir el lavado anteriormente descrito por lo menos dos veces hasta que el sobrenadante se observe totalmente transparente.

h).- Añadir 3 mililitros de agua bidestilada libre de dióxido de carbono así como 1/4 parte del volumen de Tolueno, posteriormente agitar vigorosamente durante un minuto.

i).-Centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos y separar el Tolueno sobrenadante así como la interfase (débris cérico celular).

j).-Almacenar en el congelador dentro de recipientes estériles la hemoglobina así purificada.

V.4.5.- PREPARACION DE LA CAMARA DE ELECTROFORESIS.  
(31)

- a).- Preparar el buffer de Tris-barbital de pH 8.6
- b).- Llenar la cámara de electroforesis y encender la fuente de poder.
- c).- Tapar la cámara y dejar pasar la corriente a 250 V por espacio de cinco minutos con el fin de estabilizar el sistema.

**V.4.6.- CORRIMIENTO ELECTROFORETICO: . (31)**

- a).- Humedecer las membranas de acetato de celulosa en un poco de la solución de Tris-barbital para a continuación fijarlas a los puentes de la cámara.
- b).- Aplicar seis muestras diferentes sobre cada membrana. En cada prueba correr muestras de control ( en éste caso se corrieron paralelamente Hemoglobina Alfa y Hemoglobina Fetal).
- c).- Efectuar el corrimiento a 250 Voltios, 2.5 miliamperes, durante 30 minutos.

**V.4.7.- TINCION DE LAS MEMBRANAS: . (31)**

- a).- Tomar con ayuda de las pinzas cada una de las membranas y sumergirlas en una solución de Rojo de Ponceau S al 1% (en ácido acético al 5%) durante 5 minutos.

b).- Sacar las membranas y pasarlas a otra cuba y lavar con ácido acético al 5% varias veces hasta eliminar el exceso del colorante, si se desea pueden ser deshidratadas y aclaradas sumergiendo primero en etanol absoluto durante 5 minutos y posteriormente en otra solución de ácido acético-metanol por espacio de 5 minutos también.

c).- Comparar las movilidades de las bandas de cada problema con los controles.

La identificación básica de un tipo de hemoglobina desconocido se efectúa por comparación de las velocidades de migración o distancias recorridas de las muestras en relación con los controles como puede apreciarse en la gráfica No. 3.

Por éste método las hemoglobinas migran del polo negativo al positivo, en caso de presentarse hemoglobinas anormales éstas pueden ser identificadas y/o cuantificadas por alguno de los siguientes métodos:

a).- Solubilidad de fosfatos (prueba específica para la hemoglobina S).

b).- Desnaturalización alcalina (prueba específica para la hemoglobina fetal).

c).- Densitometría.

G R A F I C A   N o   3

**DISTANCIAS DE CORRIMIENTO ELECTROFORETICO  
DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE HEMOGLOBINAS  
NORMALES Y ANORMALES. (31)**

ELECTROFORESIS pH 8.6		Hb	ELECTROFORESIS pH 6.5		SOLUBILIDAD	OTRAS CARACTERISTICAS
+		A	+		NORMAL	-
		F			ALTA	ALCALI RESISTENTE
		S'			DISMINUIDA	DREPANOCITOSIS
		C'			ALTA	FORMACION INTRACELULAR DE CRISTALES.
		D			Hb DISMINUIDA Hb REDUCIDA NORMAL	NO DREPANOCITOSIS.
		E			--	--
		G			DISMINUIDA	--
		H			--	CUERPO DE INCLUSION
		I			NORMAL	
		J			--	--
		K			DISMINUIDA	--
		A <sup>2</sup>			NORMAL	--
		L <sup>1</sup> B			--	--
		L <sup>2</sup> B			--	--
		L			DISMINUIDA	--
		DUN HAB			--	--
		GALVES YONE			--	--

## VI.- OBSERVACIONES Y RESULTADOS

A un total de 217 donadores se les determinó si eran portadores de hemoglobinas anormales mediante exámen de electroforesis a pH 8.6 en Tris-barbital, se determinó además su valor de hematocrito, fróctis sanguíneo y se indagó acerca de su origen, encontrándose lo siguiente:

### HEMOGLOBINAS ANORMALES;

De las 217 muestras de donadores sanos sometidas a estudio, ninguna de ellas presentó un desplazamiento anormal en la electroforesis con respecto a velocidad de migración y/o a distancia recorrida; lo cual nos indica la inexistencia de homoglobinas anormales en relación a los estándares de hemoglobina "A" y hemoglobina "F" utilizados.

No es de sorprender éste resultado, pues en estudios realizados a un grupo de 1000 donadores del "Centro Médico la Raza" tan solo lograron detectarse 9 de ellos con hemoglobinas anormales ( es decir el 0.9% ), situación que, consideramos pudiese haberse presentado en el caso de no trabajar con voluntarios ( ya que el número de muestras fué significativo ) y haberlo hecho con "donadores" que comercializaban su sangre, tomando en cuenta que quizás el número de ellos hubiese sido mayor, de ninguna manera se pretende relacionar que a mayor donación mayor riesgo de alteraciones en la hemoglobina.

En todos los casos estudiados la distancia que migraron las muestras de hemoglobina fué de 0.8 cms. ( ver figura No. 3 ).

#### HEMATOCRITO:

Se determinó el valor del hematocrito separando a los donadores en hombres y mujeres, encontrándose los siguiente:

El valor promedio del hematocrito para los 93 hombres fué de 48.6% con valores extremos de 52% y 41% así como una desviación estándar de  $\pm 3.6\%$  .

Para las 124 mujeres el valor promedio de hematocrito fué de 43.37% con valores extremos de 47% y 36% así como una desviación estándar de  $\pm 2.85$ .

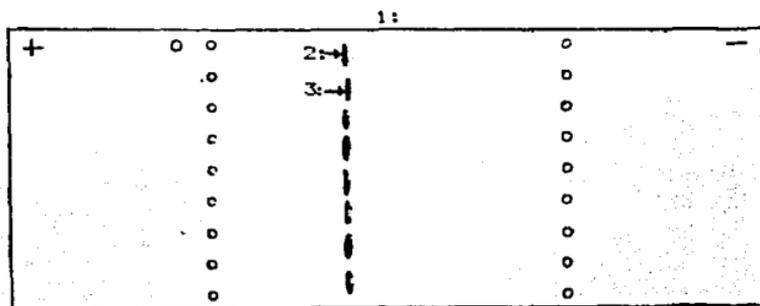
#### ASCENDENCIA U ORIGEN:

Aún cuando gran parte de los donadores son originarios de Distrito Federal y/o Área Metropolitana hemos considerado conveniente indagar acerca de su ascendencia (principalmente sus progenitores), encontrándose los resultados que se resúmen en la tabla No. 3.

Asimismo en la figura No. 4 se han llevado los datos de la tabla No. 3 a un mapa de la República Mexicana en el cual es de notar la incidencia en cuanto al orón de los donadores principalmente sobre el Distrito Federal y estados circunvecinos (exceptuando el estado de Tlaxcala) lo cual de alguna manera apoya la finalidad del presente trabajo.

FIGURA NUMERO 3

EJEMPLO DE LOS CORRIMIENTOS EN UNA MEMBRANA DE  
ACETATO DE CELULOSA EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.



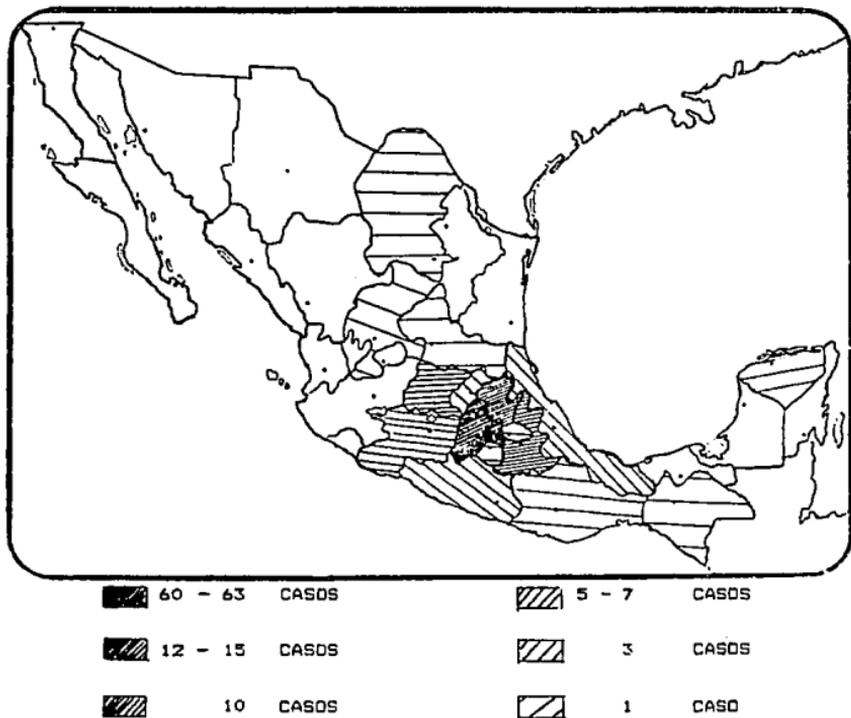
- 1' ZONA DE APLICACION  
2: MUESTRA ESTANDARD DE Hb A  
3: MUESTRA ESTANDARD DE Hb F

**TABLA NUMERO 3**  
**INCIDENCIA EN CUANTO AL ORIGEN DE LOS**  
**DONADORES O DE SUS PROGENITORES.**

<b>ENTIDAD</b>	<b>FRECUENCIA</b>	<b>%</b>
DISTRITO FERERAL	63	29.03
ESTADO DE MEXICO	60	27.67
HIDALGO	15	6.91
PUEBLA	13	6.00
GUANAJUATO	12	5.53
MICHOACAN	10	4.60
VERACRUZ	7	3.22
GUERRERO	6	2.76
QUERETARO	5	2.30
MORELOS	3	1.38
OAXACA	3	1.38
YUCATAN	3	1.38
COAHUILA	1	0.46
CHIAPAS	1	0.46
SAN LUIS POTOSI	1	0.46
TLAXCALA	1	0.46
ZACATECAS	1	0.46
DTRO (S)	12	5.52
<b>TOTALES</b>	<b>217</b>	<b>100.00%</b>

FIGURA NUMERO 4

LOCALIZACION GEOGRAFICA EN CUANTO A LA INCIDENCIA DEL  
LUGAR DE ORIGEN DE LOS DONADORES O DE SUS PROGENITORES.



De los 217 donadores voluntarios muestreados al azar en la Facultad de Estudios Superiores Cautitlan se les aplicó a cada uno de ellos una encuesta en una hoja de registro en la cual se evaluaron los aspectos mas importantes acerca de su estado de salud, hábitos etc. Se les tomó una muestra de sangre la cual después de ser preparada correctamente se examinó electroforéticamente en un buffer de tris-barbital de pH=8.6 y utilizando como medio de soporte el acetato de celulosa, se determinó además el hematocrito así como también se elaboró un fróntis sanguíneo con el fin de detectar posibles anomalías en los eritrocitos.

De acuerdo con las encuestas los donadores fueron primeramente separados hombres de mujeres, agrupándose en ocho clases de acuerdo con su edad ( en cada clase el intervalo fué de 2 años ), se obtuvieron los promedios de peso corporal, hematocrito y corrimiento electroforético.

Las tablas que resumen los resultados así como los histogramas y polígonos de frecuencia correspondientes se mostrarán a continuación.

T A B L A   N o .   4

**DISTRIBUCION PARA LOS DONADORES UARONES**

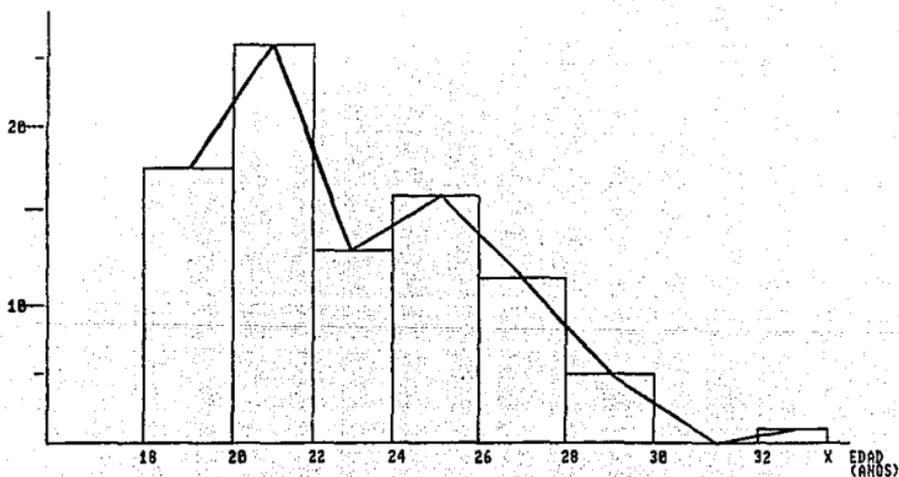
( 93 DE 217 = 42.85% )

CLASE (EDAD EN AÑOS)	FRECUENCIA	PROMEDIO DE PESO EN Kg.	HEMATOCRITO PROMEDIO %	CORRIENTE ELECTROFORETICO (CMS.)
18-20	18	67.8	51.7	0.8
20-22	26	64.0	51.6	0.8
22-24	14	63.3	50.5	0.8
24-26	17	70.0	51.7	0.8
26-28	12	86.0	48.5	0.8
28-30	5	73.6	46.6	0.8
30-30	0	--	--	--
32 Y MAS	1	76.0	40.0	0.8
		X=71.2	X=48.6	

**GRAFICA No. 4**

**HISTOGRAMA Y POLIGONO DE FRECUENCIA  
POR EDADES PARA LOS DONADORES UARONES**

FRECUENCIA



T A B L A N o 5

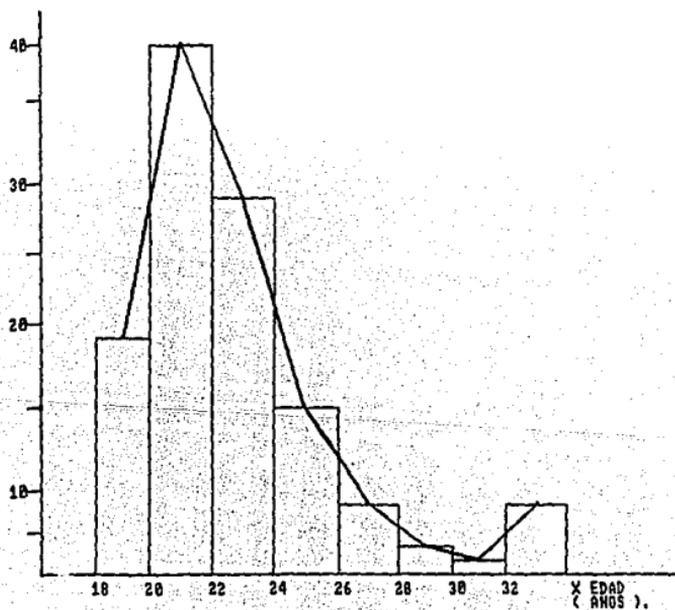
DISTRIBUCION PARA LOS DONADORES MUJERES.

< 124 DE 217 = 57.14% >

CLASE (EDAD EN AÑOS)	FRECUENCIA	PROMEDIO DE PESO EN Kg.	HEMATOCRITO PROMEDIO %	CORRIENTE ELECTROFORÉTICO (CMS.)
18-20	19	58.42	41.88	0.8
20-22	40	56.22	46.60	0.8
22-24	29	55.55	44.20	0.8
24-26	15	54.00	40.70	0.8
26-28	8	49.37	44.30	0.8
28-30	3	56.00	42.00	0.8
30-32	2	53.00	40.90	0.8
32 Y MAS	8	66.5	46.4	0.8
		$\bar{x}=56.13$	$\bar{x}=43.37$	

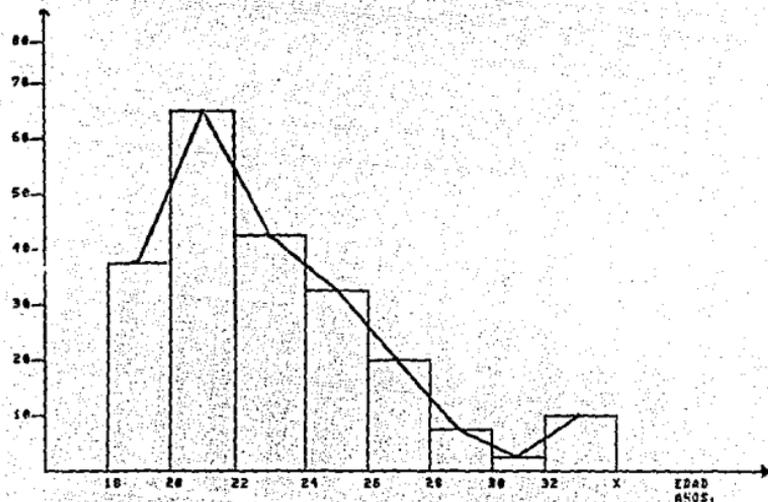
**GRAFICA No 5**

**HISTOGRAMA Y POLIGONO DE FRECUENCIA POR  
EJEDES PARA LOS DONADORES MUJERES**



G R A F I C A   N o .   6

HISTOGRAMA Y POLIGONO DE FRECUENCIA GLOBAL.



CLASE	FRECUENCIA
18-20	37
20-22	66
22-24	43
24-26	32
26-28	28
28-30	8
30-32	2
32 Y MAS	9

Como podemos apreciar en los histogramas y en los polígonos de frecuencia (especialmente en los globales), la mayor parte de los donadores que contribuyeron con el presente trabajo son jóvenes cuyas edades oscilan entre los 18 y 26 años, al analizar las encuestas notamos que en su totalidad son personas sanas tanto en su estado actual como en sus antecedentes genéticos con una alimentación aceptable en cuanto a contenido y variedad de nutrientes.

## VII.- D I S C U S I O N

- 1.- Bajo las condiciones en las que se efectuó el corrimiento electroforético en este caso (250 Voltios, 2.5 mAmp, en buffer de Tris-barbital de pH.8.6 ) la Hemoglobina migró al cátodo tan solo 0.8 cms.
- 2.- En cada una de las clases los hematocritos parecen estar algo elevados, sin embargo los promedios generales se ajustan bastante a los reportados en la literatura. Curiosamente en los varones se observa una tendencia a la disminución en el hematocrito a medida que aumenta la edad, mientras que en las mujeres se mantiene mas o menos constante.
- 3.- En relación con los fróntis sanguíneos, en ningún caso se observaron anomalías ni en el tamaño ni en la forma de los eritrocitos lo cual descarta aún más la existencia de hemoglobinas anormales en la muestra estudiada.
- 4.- Como ya se ha mencionado anteriormente, en cada tira se corrieron dos controles de hemoglobina paralelamente con las muestras de los donadores.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## VIII.- CONCLUSIONES

- 1.- Mediante éste tipo de estudios tratamos de detectar además de alteraciones en la hemoglobina, anormalidades en la forma y en el tamaño de los eritrocitos (poiquilocitosis y anisocitosis).
- 2.- Estudios realizados anteriormente a 1987 en donadores profesionales revelaron una incidencia de 0.9 %, de ésta manera en caso de que la población muestreada fuese de tal tipo se hubieran esperado quizá dos casos anormales.
- 3.- El corrimiento de las muestras sobre las membranas de celulosa contra los controles ( Hb A y Hb F ) arrojó resultados claros.

4.- Consideramos que los datos registrados en las hojas de control acerca de los hábitos de cada voluntario nos orientan acerca de las condiciones generales de salud de cada uno de ellos, además de arrojar información acerca de antecedentes patológicos (propios o familiares), en cuyos casos nada encontramos acerca de indicios de hemoglobinopatías consanguíneas.

5.- La realización de éste tipo de estudios es importante pues solo se han llevado a cabo en cierto tipo de poblaciones en las cuales, por así decirlo, es de esperarse cierta incidencia, sin embargo no se habían realizado en una población de individuos residentes en el Distrito Federal y Áreas Circunvecinas, además una población joven, sana y activa, por tanto podemos inferir no encontramos hemoglobinopatías como factor de riesgo, por ejemplo, en una posible transfusión.

## IX- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- WEATHERALL D. G., CLEGG J. B.. MOLECULAR GENETICS OF HUMAN HEMOGLOBINS. REV. GENET.. 10. 157-158. 1976.
- 2.- CISCAR F. FARRERAS P. DIAGNOSTICO HEMATOLOGICO, LABORATORIO Y CLINICA. JIMS. II. MEXICO. 1387-1446. 1972.
- 3.- WILLIAMS J. W., BUTLER M. D., ERSLEV A. J.. HEMATOLOGY. I, SALVAT. ESPAÑA 413-419-1975.
- 4.- MUÑOZ Y LAVALLE. UN CASO DE ANEMIA DE CELULAS EN HOZ Y DREPANOCITEMIA. VOL. MED. HOSP. DE MEX.. 7 (3). 1950.
- 5.- COLOMBO B., MARTINEZ G.. HAEMOGLOBINOPATHIES INCLUDING THALASSEMIA IN TROPICAL AMERICA. CLINICS IN HEMATOLOGY. 10 (3). 730-756. 1981.
- 6.- LOPEZ SANTOS OLIVIA. DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LAS HEMOGLOBINOPATIAS. TESIS UNAM. MEXICO. 94. 1985.

- 7.- KULOZIK A. E., LYONS J., KOHNE E. , BARTRAM C. R., LEIHAEUER E.. **RAPID AND NON-RADIOACTIVE FENATAL DIAGNOSIS OF BETA THALASEMIA AND SCKLE CELL DISEASE: APLICATION OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION.** BR. J. HAEMATOLOGY. 70 (4). 455-458.1988.
- 8.- VIDAUD-RAPHNAUD D., BADOVAL J., LABIE D., **A CASE OF HEREDITARY PERSISTENCE OF FETAL HEMOGLOBIN DUE TO A MUTATION IN 5' OF THE  $\alpha$  GAMMA GENE.** ARCH. FR. PEDIATR... 45 (5).315-317. 1988.
- 9.- ROWLEY P. T.. **FENATAL SCREENING FOR HEMOGLOBINOPATHIES.** AM. HUM. GENET.. 49 (2). 446-467- 1991.
- 10.- LOADER S., SUTERA C.J., WALDEN M., KOZYRA A., ROWLEY P. T., **FENATAL SCREENING FOR HEMOGLOBINOPATHIES II, EVALUACION OF COUNSELING.** AM. HUM. GENET.. 48 (3). 447-451. 1991.
- 11.- ROWLEY P. T., LOADER S., SUTERA C.J., WALDEN M., KOZYRA A.. **FENATAL SCREENING FOR HEMOGLOBINOPATHIES I.** AM. HUM. GENET. 48 (3).430-446. 1991.
- 12.- ROWLEY P. T., LOADER S., SUTERA C.J. WALDEN M., KOZYRA A.. **FENATAL SCREENING FOR HEMOGLOBINOPATHIES III. APPLICABILITY OF THE HEALTH BELIEF MODEL.** AM. HUM. GENET. 48 (3). 452-459. 1991.

- 13.- MOLCHANOVA T.P., MIRGORODSKAYA O. A., ABATORUV L. V.,  
 PODTELEZHNIKOV A.V., TOKAREV YU N., GARACHEV S.A. LOCALIZATION  
 OF AMINOACID SUBSTITUTIONS IN HUMAN HEMOGLOBIN, MASS-SPECTRAL  
 APPROXIMATE ANALYSIS OF TRYPTIC PEPTIDES. MOL. BIOL.. 23 (1).  
 169-180. 1989.
- 14.- GUPTA A.K., KIRCHNER K. A., NICHOLSON R., ADAMS J. G.,  
 SCHECHTNER A.N., NOGUCHI C.T., STEINBERG M. H..EFFECTS OF  
 ALPHA-THALASSEMIA AND SICKLE POLIMERIZATION TNDENCY ON THE  
 URINE-CONCENTRATIONS DEFECT ON INDIVIDUALS WITH SICKLE CELL  
 TRAIT.. J. CLIN. INVEST.. 88 (6). 1963-1968. 1991.
- 15.- FISCHEL-GHODSIAN N., HIRSCH P. C., BOHLMAN M. C.. RAPID  
 DETECTION OF THE HEMOGLOBIN C MUTATION BY ALLELE SPECIFIC  
 POLYMERASE CHAIN REACTION. AM. J. HUM. GENET.. 47 (6).  
 1023-1024. 1990.
- 16.- NAGEL R. L., ERLINGSSON S., FABRY M. E., CROZIAT H., SUSUKA  
 S.M., LACHMAN H., SUTTON M., DRISCOL C., BOUHASSIRA E.,  
 BILLET H.H..THE SENEGAL DNA HAPLOTYPE IS ASSOCIATED WITH  
 THE AMELIORATION OF ANEMIA IN AFRICAN-AMERICAN SICKLE CELL  
 ANEMIA PATIENTS. BLOOD. 77 (6). 1371-1375.1991.

- 17.- CHUI D. H. K., PATTERSON M., DOWLING C.E., KAZAZIAN H. H.,  
KENDALL A.G..HEMOGLOBIN BART'S DISEASE IN AN ITALIAN BOY,  
INTERACTION BETWEEN ALPHA-THALASSEMIA AND HEREDITARY  
PERSISTENCE OF FETAL HEMOGLOBIN. N. ENGL. J. MED. 323 (3),  
179-182. 1990.
- 18.- ZHANG JU-WU, STAMATOYANNOPULOS G., ANAGNOU N.F. LOATIAN  
(DELTA-BETA) DEGREE-THALASSEMIA: MOLECULAR CHARACTERIZATION  
OF A NOVEL DELETION ASSOCIATED WITH INCREASED PRODUCTION OF  
FETAL HEMOGLOBIN. BLOOD. 72 (3). 983-988. 1988.
- 19.- LIN LIANG-IN, LIN KUO-SIN, LIN KAI-HSIN, CHENG TIN-YING. A  
NOVEL- (E1C-A) MUTANT IDENTIFIED IN AMPLIFIED GENOMIC DNA OF  
A CHINESE BETA-THALASSEMIC PATIENT. AM. J. HUM. GENET.. 50  
(1). 237-238. 1992.
- 20.- DASH S., WILSON J. B., WEBBER B.B., KUTLAR A., HUISMAN T. H.  
J.. Hb CANDIGARRH OF ALPHA 2 BETA 204 (Fgl.) ASP ARROW RIGHT  
GLY OBSERVED IN AN INDIAN FAMILY. HEMOBLOBIN. 13 ( 7-8 ).  
749-752. 1989.

- 21.- FODDE R., LOSEKOOT M., CASULA L., BERNINI L. F.. NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE BELGIAN SUPER (G) GAMMA SUPER (H) SUPER (A) GAMMA DELTA BETA) SUPER (O)-THALASSEMIA DELETION BREAKPOINT SUGGESTS A COMMON MECHANISM FOR A NUMBER OF SUCH RECOMBINATION EVENTS. GENOMICS. 8 (4) . 732-735. 1990.
- 22.- LOSEKOOT M., FODDE R., VAN HEEREN H., HARTEVELD CL L., GIORDANO P.C., BERNINI L. F. . A NOVEL FRAMESHIFT MUTATION (FSC 47 (H)) CAUSING BETA-THALASSEMIA IN A SURINAM PATIENT. HEMOGLOBIN 14 (4). 467-470. 1990.
- 23.- BASHIR-N., BARKAWI-M., SHARIF-L., PREVALENCE OF HAEMOGLOBINOPATHIES IN SCHOOL CHILDREN IN JORDAN VALLEY. ANNALS OF TROPICAL PAEDITRICS. 11 (4). 373-376-1991.
- 24.- CHOUBISA-S-L.. DISTRIBUTION OF Hb-BART'S (ALPHA-THALASSEMIA) IN VARIOUS POPULATIONS OF DUNGARPUR DISTRICT OF RAJASTHAN (INDIA). INDIAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY AND HUMAN GENETICS. 16 (1-2). 43-48. 1990.

- 25.- BOURANTAS- K-L.- GEORGIU-I., SEFERIADIS-K., QUANTITATION OF HbF GAMMA-CHAIN TYPES BY HPLC IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME. HAEMATOLOGICA. 76 (4). 337-338. 1991.
- 26.- LIN-C-K., LEE-S-H., WANG-C-C., HSU-H-C.. ALPHA-THALASSEMIC TRAITS ARE COMMON IN TAIWANESE POPULATION: USEFULNESS OF A MODIFIED HEMOGLOBIN H PREPARATION FOR PREVALENCE STUDIES. JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE. 118 (6). 599-603. 1991.
- 27.- ZAGO M. A., PACO-LARSON M. L.. HEMOGLOBIN H DISEASE CAUSED BY TWO GENE DELETIONS. BRAZ-J-MED-BIOL-RES. 22(6). 675-681. 1989.
- 28.- DAMYANOVA L.. ELECTROPHORETIC HbA<sub>2</sub> ASSESSMENT IN ISCHEMIC HEART DISEASE. Z-MED-LAB-DIAGN.. 30 (8). 437-439. 1989.
- 29.- FUCHARDEN S., WINICHAGOON P., THONGLAIRUAM V., SIRIBOON W., SEAE NGOW B. LABORATORY DIAGNOSIS FOR THALASSEMIA. ANN-ACAD-MED-SINGAPORE. 18 (4). 424-430. 1989.

- 30.- PATERAKIS G. S., TERZOGLU G., VASILIDY E... THE PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF AN EXPERT SYSTEM FOR THE "ON-LINE" ASSESMENT OF THALASSEMIA TRAIT AND IRON DEFICIENCY-MICRO-HEMA SCREEN. BLOOD-CELLS 15. 541-560. 1989.
- 31.- NERENBERG S.T.. ELECTROFORESIS, MANUAL PRÁCTICO DE LABORATORIO. JIMS. BARCELONA, ESPAÑA. 260 . 1968.
- 32.- RUIZ REYES G. HEMOGLOBINAS ANORMALES Y TALASEMIAS EN MEXICO. SANGRE. 18: 333-340. 1973.
- 33.- IBARRA B., ZUNIGA P., RAMIREZ MA. DE L.. DETECCION DE ALTERACIONES DE LA HEMOGLOBINA EN UN MUESTRA DE POBLACION DEL NOROCCIDENTE DE MEXICO. ARCH. INVEST. MED. . MEX. 11. 491. 1980.
- 34.- RUIZ REYES G. HEMOGLOBINAS ANORMALES EN UN POBLACION HOSPITALARIA DE LA CIUDAD DE PUEBLA. LIBRO DE RESUMENES, VIII JORNADAS ANUALES, GRUPO MEX. DE EST. EN HEMATOL. MEX. 1967.

- 35.- GARZA-CHAPAS R. GENETICA DE POBLACIONES DEL ESTADO DE NUEVO LEON, DISTANCIAS GENETICA PARA LOS GRUPOS SANGUINEOS "A" "B", "O" Y Rh (+). IV CONGRESO NACIONAL DE GENETICA HUMANA PUEBLA, PUE. RESUMEN DE TRABAJOS LIBRES. 25. 1978.
- 36.- LISKER RUBEN. RUIZ REYES GUILLERMO AND LORIA ALVAR. STUDIES ON SEVERAL GENETIC HEMATOLOGIC CHARACTERISTICS OF THE MEXICAN POPULATION, IV THE FINDING OF A FAST HEMOGLOBIN COMPONENT (HEMOGLOBIN MEXICO) IN AN INDIAN FAMILY BLOOD. 22 (3). 1963.
- 37.- HERSLEV. A. J. CONTROL OF RED CELL PRODUCTION ANN. REV. MED.. 315. 1969.
- 38.- ESPINOS PEREZ., ALVAREZ L., SALA WALTER.. FISIOLOGIA DE LA SERIE ERITROCITICA Y CLASIFICACION DE LAS ANEMIAS. MEDICINA I. 15-30. 1982.
- 39.- HUISMAN T.H. J., SHOEDER W.. NEW ASPECTS OF THE STRUCTURE AND FUNCTION AND SYNTHESIS OF THE HEMOGLOBINS. BUTTERWORTH, LONDON. 1971.
- 40.- HUENHAS E. R., DANCE N., BEAVEN G. H.. COLD SPRING HARBOR SIMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY. 29. 327-331. 1964.

- 41.- SAENZ G.F.. CLASIFICACION TOPOGRAFICA DE LAS HEMOGLOBINAS ANORMALES. REV. BIOL. TROP.. 24 (1). 57-68. 1976.
- 42.- GROSS KÖLN R., SCHOLMERICH MARG P.. MANUAL DE MEDICINA INTERNA. I. REVERTE. 148-149.
- 43.- BOYER RODNEY E. MODERN EXPERIMENTAL BIOCHEMISTRY. THE BENJAMIN CUMMINGS PUBLISHING CO. INC. U.S.A. 584. 1986.
- 44.- LUBLIN B.H., WITKOWSKA H. E., KLEMAN K. L LABORATORY DIAGNOSIS OF HEMOGLOBINOPATHIES. CLIN. BIOCHEM.. 24 (4). 365-374. 1991.
- 45.- STAMATOYANNOPOULOS G., BELLINGHAM A. J., LENFANT C., FINCH C. HEMOGLOBINAS ANORMALES CON ALTA Y BAJA AFINIDAD POR EL OXIGENO. ANNUAL REVIEW OF MEDICINE. 22. 1971.
- 46.- TODD SANFORD, DAVIDSON L. DIAGNOSTICO CLINICO POR EL LABORATORIO. SALVAT. ESPAÑA. 224-255, 566, 566-567.